
Wechselspiel zwischen Doppelstrangbruch-Reparatur und Zellzyklus-Kontrolle am G2/M-Übergang

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Eik Schumann

aus Hamburg-Harburg

Darmstadt 2011

D17

Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Löbrich

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Adam Bertl

Tag der Einreichung: 28.01.2011

Tag der mündlichen Prüfung: 28.03.2011

Diese Dissertation wurde in der Zeit von Mai 2006 bis Januar 2011 am Institut für Biophysik der Universität des Saarlandes, sowie in der Abteilung Strahlenbiologie und DNA-Reparatur der Technischen Universität Darmstadt unter Leitung von Prof. Markus Löbrich angefertigt.

*„Ein ominöses Verfahren
brachte die Lösung nach Jahren.“*

Die Fantastischen Vier (2004)

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	5
2.1	ENTSTEHUNG VON DNA SCHÄDEN	6
2.1.1	<i>Ionisierende Strahlung (IR) und ihre Wechselwirkung mit Materie</i>	<i>6</i>
2.1.2	<i>Schäden an der DNA</i>	<i>8</i>
2.2	ZELLZYKLUS UND ZELLZYKLUSREGULATION	9
2.2.1	<i>Der G1/S- und Intra S-Checkpoint</i>	<i>11</i>
2.2.2	<i>Der G2/M- und der mitotische Checkpoint</i>	<i>12</i>
2.3	SCHADENSERKENNUNG, FOCI-ENTSTEHUNG UND SIGNALVERSTÄRKUNG (DIE PRIMÄRE SCHADENSANTWORT)	14
2.4	REPARATURWEGE VON DSBs	17
2.4.1	<i>Non Homologous End Joining (NHEJ)</i>	<i>17</i>
2.4.2	<i>Homologous Recombination (HR)</i>	<i>19</i>
2.5	LEBENDZELLMIKROSKOPIE	21
2.6	MOTIVATION UND ZIELSETZUNG	23
3	MATERIAL UND METHODEN	25
3.1	MATERIAL UND CHEMIKALIEN	25
3.1.1	<i>Zelllinien</i>	<i>28</i>
3.2	ZELLKULTUR	29
3.2.1	<i>Passagieren von Zelllinien</i>	<i>29</i>
3.2.2	<i>Einfrieren von Zellen</i>	<i>30</i>
3.2.3	<i>Auftauen von Zellen</i>	<i>30</i>
3.2.4	<i>Aussaat</i>	<i>30</i>
3.2.5	<i>Aphidicolin-Behandlung</i>	<i>30</i>
3.3	BESTRAHLUNG	31
3.4	IMMUNFLUORESCENZ-MIKROSKOPIE	31
3.4.1	<i>Fixierung</i>	<i>31</i>
3.4.2	<i>Antikörper-Färbung</i>	<i>31</i>
3.4.3	<i>Mikroskopmodelle</i>	<i>32</i>
3.4.4	<i>Automatische Bestimmung der Zellzyklus-Phase</i>	<i>32</i>
3.4.5	<i>Bildaufnahme</i>	<i>33</i>
3.4.6	<i>Bildverarbeitung</i>	<i>33</i>
3.5	LEBENDZELLMIKROSKOPIE	34

3.5.1	<i>Zellkultur</i>	34
3.5.2	<i>Bestrahlung der μSlides</i>	34
3.5.3	<i>Lebendzellmikroskop</i>	35
3.5.4	<i>Mikroskopsteuerung und Bildverarbeitung</i>	36
3.6	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	37
3.6.1	<i>Zellernte und Fixierung für Durchflusszytometrie</i>	37
3.6.2	<i>phospho-H3 / Propidiumiodid-Färbung</i>	37
3.7	QUANTIFIZIERUNG VON ANAPHASE-BRÜCKEN	38
4	ERGEBNISSE	39
4.1	ETABLIERUNG DER LEBENDZELLMIKROSKOPIE.....	39
4.1.1	<i>Kultivierung und Positionierung der Zellen unter dem Mikroskop</i>	40
4.1.2	<i>Entwicklung der Mikroskopsteuerung</i>	42
4.1.3	<i>Ablauf eines Lebendzellmikroskopie-Versuchs</i>	43
4.1.4	<i>Einfluss von Inkubation und Beobachtung auf den Mitotischen Index</i>	44
4.1.5	<i>Einfluss von Inkubation und Beobachtung auf das Reparaturverhalten</i>	46
4.1.6	<i>Schwankungen der Signalqualität von GFP-53BP1 im Zellzyklus</i>	49
4.1.7	<i>Das GFP-53BP1 Signal in der frühen G1-Phase</i>	51
4.2	REPARATUR UND ZELLZYKLUS-REGULATION NACH BESTRAHLUNG AM G2/M-ÜBERGANG.....	52
4.2.1	<i>Der G2/M-Checkpoint in U-2 OS Zellen</i>	52
4.2.2	<i>Untersuchung der DSB-Reparatur anhand von GFP-53BP1-Foci</i>	56
4.2.3	<i>Zusammenspiel von DSB-Reparatur und Zellzyklus-Verhalten am G2/M-Übergang</i>	58
4.3	CHARAKTERISIERUNG DER VON G2 IN DIE MITOSE GELANGENDEN SCHÄDEN.....	62
4.3.1	<i>Anaphase-Brücken nach Bestrahlung in G2</i>	62
4.4	GFP-MDC1-FOCI IN DER MITOSE	65
4.4.1	<i>Aufnahmebedingungen mitotischer GFP-MDC1-Foci</i>	65
4.4.2	<i>Verfolgung und Quantifizierung von in G2 induzierten mitotischen Foci</i>	67
4.4.3	<i>Verteilung von GFP-MDC1 Foci auf die Tochterzellen</i>	70
4.4.4	<i>Verteilung von γH2AX-Foci auf die Tochterzellen</i>	71
4.5	VERTEILUNG VON γ H2AX-FOCI AUF DIE TOCHTERZELLEN, NACH INHIBITION DER HR	73
5	DISKUSSION	76
5.1	ETABLIERUNG DER LEBENDZELLMIKROSKOPIE.....	76
5.1.1	<i>Das Lebendzellmikroskop</i>	76
5.1.2	<i>Der MI in der Lebendzellmikroskopie</i>	77
5.1.3	<i>Zellzyklusbestimmung in der Lebendzellmikroskopie</i>	79
5.2	DIE UNTERSUCHUNG DER DSB-REPARATUR IN DER LEBENDZELLMIKROSKOPIE	80
5.2.1	<i>Unterschiede in der GFP-53BP1-Signalqualität während des Zellzyklus</i>	80

5.2.2	Die primäre Schadensantwort während der Mitose	81
5.2.3	Die verwendeten DSB-Marker im Vergleich	83
5.3	WECHSELSPIEL ZWISCHEN DSB-REPARATUR UND ZELLZYKLUSKONTROLLE AM G2/M-ÜBERGANG	87
5.4	ANAPHASE-BRÜCKEN IN G2-BESTRAHLTEN ZELLEN	89
5.5	KORRELIERTE FOCI-PAARE IN TOCHTERZELLEN	91
5.6	BEITRÄGE VON NHEJ UND HR ZUR AUSBILDUNG VON ANAPHASE-BRÜCKEN	93
5.7	AUSBLICK	96
6	LITERATURVERZEICHNIS	98
7	ANHANG	105
7.1	MAKRO ZUR MESSUNG DER SIGNALQUALITÄT IN ZEITSERIEN AUS DER LEBENZELLMIKROSKOPIE	105
7.2	VOLLSTÄNDIGE ABBILDUNGEN ZU DEN FOCI-ZÄHLUNGEN IN DER LEBENDZELLMIKROSKOPIE NACH 1 Gy	107
7.3	VOLLSTÄNDIGE ABBILDUNGEN ZU DEN FOCI-ZÄHLUNGEN IN DER LEBENDZELLMIKROSKOPIE NACH 2 Gy	108
7.4	BESCHREIBUNGEN ZU DEN BEIGELEGTE FILMEN	109
7.4.1	Film-Anhang 1	109
7.4.2	Film-Anhang 2	109
7.4.3	Film-Anhang 3	109
7.4.4	Film-Anhang 4	110
7.5	LEBENS LAUF	111
7.6	DANKSAGUNG	112
7.7	TAGUNGSBEITRÄGE:	113
7.7.1	Vorträge	113
7.7.2	Poster	113
7.8	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	114

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ATM and Rad3 related</i>
bp	Basenpaar
BRCA	<i>breast cancer early onset</i>
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxy-Uridin
BSA	bovines Serumalbumin
CDK	Cyklin-abhängige Kinase (<i>cyclin-dependent protein kinases</i>)
Chk1/2	Checkpoint-Kinase 1/2
CtIP	<i>CtBP-Interacting Protein</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's MEM
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)</i>
DNA-PKcs	<i>DNA dependent protein kinase catalytic subunit</i>
DSB	<i>DNA-Doppelstrangbruch (double-strand break)</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	<i>Fötales Kälberserum (fetal calf serum)</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gy	Gray (Einheit der Strahlendosis)
h	Stunde
HR	Homologe Rekombination
IF	Immunfluoreszenz
IR	<i>Ionisierende Strahlung (ionizing radiation)</i>
LCI	<i>Lebendzellmikroskopie (live cell imaging)</i>
mA	Milliamper
Mbp	Megabasenpaare
MEM	<i>minimal essential medium</i>
min	Minute
MRN	Proteinkomplex aus MRE11, RAD50 und NBS1
Nbs	<i>Nijmegen Breakage Syndrome</i>
NEAA	<i>Nicht-essentielle Aminosäuren (non-essential amino acids)</i>
NHEJ	<i>Nicht homologe Endverknüpfung (non-homologous end-joining)</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	<i>Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)</i>
PI	Propidiumiodid
RNA	<i>Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)</i>
RNAse	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>

RPA	Replikations-Protein A
RT	Raumtemperatur
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
ssDNA	<i>einzelsträngige DNA (single stranded DNA)</i>
V(D)J	<i>variable (diversity) joining</i>
v/v	<i>volume per volume (Volumenprozent)</i>
w/v	<i>weight per volume (Gewichtsprozent)</i>

1 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden das Checkpoint-Verhalten am G2/M-Übergang und die Reparatur der durch Röntgenstrahlen induzierten DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) in G2, M und der G1-Phase untersucht. Um diese Untersuchungen auf der Ebene einzelner Zellen durchzuführen, wurde die Technik der Lebendzellmikroskopie eingesetzt. Der erste Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Entwicklung eines Inkubators zur CO₂-Inkubation während der Mikroskopie und der Optimierung der Versuchsabläufe in der Lebendzellmikroskopie. In Zusammenarbeit mit dem Hersteller wurde die Mikroskopie-Software um Funktionen erweitert, die das zyklische Anfahren multipler Positionen auf dem Objektträger und den Umgang mit einer großen Zahl an Bildern ermöglichte. Die Aufnahmebedingungen wurden optimiert, um eine Schädigung oder Beeinflussung der Zellkultur während der Mikroskopie zu vermeiden. Neben der Technik wurden Verfahren zur Messung des Mitotischen Index und zur Messung der Reparatur von DSBs in der Lebendzellmikroskopie entwickelt, bzw. etabliert.

Nach der Etablierung und Optimierung der experimentellen Bedingungen in der Lebendzellmikroskopie wurde die Reparatur von DSBs über die Quantifizierung von GFP-53BP1-Foci untersucht und in Relation zum Zellzyklusverhalten gesetzt. Dabei zeigte sich, dass G2-bestrahlte Zellen einen G2/M-Checkpoint aktivieren, diesen jedoch zu Zeiten aufheben, zu dem die Zellen noch eine hohe Zahl an DSBs enthalten. Auf diese Weise gelangt eine beträchtliche Zahl von DSBs in die Mitose, was einen Befund aus weiteren Arbeiten unserer AG mit fixierten Zellen bestätigte.

Die Lebendzellmikroskopie ermöglichte die Verfolgung der in G2 bestrahlten Zellen durch die Mitose und in die G1-Phase hinein und damit die Untersuchung des Schicksals dieser Zellen und der Konsequenzen einer Mitose in Anwesenheit von DSBs. Es stellte sich heraus, dass Zellen, die in G2 bestrahlt wurden und sich teilten, bis 10 h nach Bestrahlung einen höheren Foci-Level aufwiesen als Zellen, die in G1 bestrahlt wurden. Dies ließ darauf schließen, dass DSBs, welche die Mitose durchlaufen haben, in G1 schlechter repariert werden können.

Die zur Kontrolle ausgewerteten Foci unbestrahlter Zellen zeigten, dass sich die Zahl spontaner Foci über die Mitose mehr als verdoppelt. Dieses Ergebnis wies auf einen Mechanismus während der Mitose hin, der die Zahl der DSBs vergrößert oder die Reparatur erschwert.

Im Folgenden wurde die Mitose, die in ihr vorhandenen DSBs und die Verteilung dieser DSBs auf die Tochterzellen näher untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass Röntgen-Bestrahlung von G2-Zellen Anaphase-Brücken induziert. Anaphase-Brücken sind DNA-Stränge, die während der Anaphase die zu trennenden Chromatiden verbinden. Dieser Befund war durch zwei Mechanismen erklärbar: (i)

Fehlerhafte Reparatur über das Nicht-Homologe End-Joining (NHEJ) führt zu dizentrischen Chromosomen, deren Chromatiden in der Anaphase nicht sauber getrennt werden können. Nach der Ausbildung einer Anaphase-Brücke kommt es zum Reißen des Chromosoms und komplexen Schäden am Chromatin. (ii) Im Zuge der DSB-Reparatur über die Homologe Rekombination (HR) werden *holliday-junctions* zwischen Schwesterchromatiden ausgebildet. Wird der HR-Vorgang nicht vor der Anaphase abgeschlossen, sind die beteiligten Chromatiden nicht sauber trennbar und die resultierende Brücke reißt unter Entstehung größerer Schäden am Chromatin. Um die Rolle der HR und damit die Rolle der unvollständigen Reparatur vor der Checkpoint-Aufhebung für die Entstehung von Anaphase-Brücken zu überprüfen, wurde die HR über eine chemische Inhibition von ATM reduziert. Die Induktion von Anaphase-Brücken nach G2-Bestrahlung ließ sich dadurch vermindern, was tatsächlich auf eine Beteiligung der HR an den Prozessen hindeutet, die in der Mitose zu Anaphase-Brücken führen.

Um die Vorgänge in der Mitose weiter zu untersuchen, wurde in der Lebendzellmikroskopie ein weiterer DSB-Marker, ein GFP-MDC1-Konstrukt eingesetzt. Im Gegensatz zu 53BP1, ist MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) auch während der Mitose am DSB lokalisiert. Sowohl in bestrahlten als auch in unbestrahlten Zellen zeigte die Analyse der mitotischen Foci einen sprunghaften Anstieg der Foci-Zahl während der Anaphase auf. Diese Ergebnisse bekräftigten das Modell, dass sowohl spontane als auch durch Röntgenstrahlung induzierte DSBs in der Anaphase zu Strukturen führen, die nicht sauber getrennt werden können. Als Folge entstehen Brücken und zusätzliche, nur schwer zu reparierende Schäden am Chromatin.

Da die in der Anaphase reißenden Strukturen und die Entstehung weiterer Schäden nicht mikroskopisch nachvollziehbar waren, wurde anhand eines mathematischen Ansatzes untersucht, ob die in G1 findenden Foci im Zusammenhang mit in der Anaphase reißenden Strukturen stehen. Nach obigem Modell sollten die DSBs nach der Anaphase an beiden Chromatiden gleichermaßen zu finden sein. Daher wurde die Verteilung spontaner und induzierter Foci, sowohl in fixierten als auch in lebenden Telophase-Zellen untersucht und gezeigt, dass die Foci-Differenz zwischen den Chromatinmassen in der Telophase geringer war, als statistisch zu erwarten war. Die untersuchten Foci waren also durch einen Mechanismus entstanden, der die DSBs paarweise auf die Schwesterzellen verteilt. Ähnlich zu den Anaphase-Brücken war es wiederum möglich, durch chemische Inhibition der HR, die koordinierte Verteilung von Foci zu vermindern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten somit darauf hin, dass ein erhöhter Foci-Level und langsamere Reparatur in G1 zumindest teilweise auf das Durchlaufen der Mitose mit HR-Intermediaten zurückzuführen ist. Dies würde bedeuten, dass ein vorzeitiges Aufheben des G2/M-Checkpoints bei nicht abgeschlossener Reparatur über HR die genomische Integrität gefährdet.

In the course of this thesis, the checkpoint behavior and the repair of ionizing radiation (IR)-induced DNA double strand breaks (DSB) at the G2/M transition has been examined.

In order to pursue these evaluations on a single cell level, the sophisticated method of live cell imaging (LCI) was used. The first part of this work emphasised on technical issues. An incubator for humidified, CO₂-enriched air on the microscope stand has been developed and the experimental procedures of LCI were optimised. In cooperation with the manufacturer, some features were added to the microscopy software, allowing the cyclic relocation of multiple positions on the slide and the management of the huge amounts of image data generated during LCI. Several imaging conditions were tested to assure that the experimental setup does not disturb or even damage the cells during LCI. Furthermore, a new assay to measure the mitotic index via LCI has been developed and the quantification of IR-induced damage foci in live cell movies was established.

After optimization of the experimental setup, DSB repair was measured in living cells using a GFP-53BP1-construct as a DSB marker. To further characterise the interactions between repair and checkpoint behaviour, the time between irradiation and mitosis was monitored for each cell evaluated. Confirming previous results from our laboratory, it became apparent that cells are prematurely released from the G2 arrest at times when cells still contain a considerable number of DSBs. Hence, most G2 irradiated cells enter mitosis with several DSBs, which is considered to threaten the genomic integrity.

Using LCI, the DSB repair in G2 irradiated cells was continuously monitored from G2 throughout mitosis and into G1, unfolding the consequences for the cell of having DSBs during mitosis. Strikingly, 10 h after irradiation G2 irradiated cells turned out to possess more foci than G1 irradiated cells. This fact pointed out an event during mitosis which hinders the repair of foci generated in G2.

The analysis of spontaneous foci was performed in a similar, cell cycle phase specific manner and showed that the number of foci in unirradiated cells is more than doubled as soon as the cell passes mitosis demonstrating that additional foci are generated in mitosis.

The mitosis, mitotic foci and the distribution of foci to the daughter cells became the subject of subsequent experiments. It was shown, that anaphase bridges can be generated by irradiating cells in G2. Anaphase bridges are chromatin-containing crosslinks between separating chromatids during anaphase. These structures are disrupted in later stages of mitosis and are known to cause severe DNA-damage. There were two possible explanations for the generation of bridges after irradiation in G2: (i) Incorrect repair via non homologous end joining (NHEJ) leads to dicentric chromosomes which cannot be divided during anaphase but generate an anaphase bridge. (ii) During repair in G2 via homologous recombination (HR) *holliday-junctions* are formed which, if not resolved until anaphase, possibly generate anaphase bridges.

To differentiate between these two possibilities, repair via HR was silenced by chemical inhibition of ATM, a protein engaged in the initiation of HR. Indeed, the induction of anaphase bridges after irradiation in G2 was attenuated. Thus, the generation of bridges is, at least in part, dependent on HR in G2.

Another DSB marker, GFP-MDC1, was used to quantify spontaneous and IR-induced foci in mitosis. In contrast to 53BP1, MDC1 locates to DSBs during cell division. In both, irradiated and unirradiated cells, the number of mitotic foci suddenly rises in anaphase. This observation gave rise to the model that DSBs in G2 cause structures hindering the chromatid separation. The resulting bridges are disrupted and additional DSBs are generated which are repaired slowly in G1 and contribute to the elevated foci levels in G1.

Since these mechanisms were not microscopically assessable, a mathematical approach was used to examine the origin of G1-foci. If the model was correct, additional foci are generated from disrupted bridges in mitosis. Without knowing the exact mechanism one can assume that after disruption of the structure there is some sort of severe damage in both of the daughter cells. Accordingly, the distribution of foci in telophase was evaluated to check for coordinated foci distribution to G1 cells. In LCI and in fixed cells IR-induced and spontaneous foci were found to be distributed too evenly to the daughter cells to be distributed by chance. Similar to the induction of anaphase bridges, chemical inhibition of HR was able to attenuate the coordinated distribution of foci revealing HR being, at least in part, responsible for the effect.

The experimental data suggests that disrupting structures during mitosis generate additional foci in G1 which are hard to repair. At least in part, these structures originate from not completed repair via HR and cells harbouring these structures enter mitosis due to an early release from the G2 arrest. This demonstrates that the insensitivity of the G2/M checkpoint threatens the genomic integrity.

2 Einleitung

Das Erbgut, die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist ein riesiges, fragiles Molekül, und die Zelle ist kontinuierlich gefordert, die Struktur dieses Moleküls zu erhalten und auch kleinste Veränderungen zu verhindern. Erbgut-schädigende Noxen sind endogenen als auch exogenen Ursprungs. Endogen entstehen hoch reaktive Verbindungen im Stoffwechsel der Zelle und reagieren mit der DNA. Weiterhin werden Doppelstrangbrüche (DSBs) von der Zellmaschinerie aber auch gezielt gesetzt, um genetische Variationen während der Meiose und der Produktion von Immunglobulinen zu generieren. Exogen entstehen DNA-Schäden durch aufgenommene Chemikalien und ionisierende Strahlung (*ionising radiation*, IR). Jede Zelle erfährt täglich viele Schädigungen aus diesen Quellen und ist durch fein abgestimmte Mechanismen in der Lage, das eigene Erbgut zu reparieren. Gelingt dies nicht werden Veränderungen (Mutationen) erzeugt, die evtl. zur Deregulierung oder zur Ausschaltung von entscheidenden Genen der Zelle führen können. Die schlimmste Folge für einen mehrzelligen Organismus ist die Entartung der Zelle und die Entstehung eines Tumors.

Die Strahlenbiologie beschäftigt sich mit der Wirkung von Strahlung auf biologische Systeme und untersucht die Mechanismen, mit denen die Zelle auf eine erfahrene Schädigung reagiert. Dies ist einerseits wichtig, um die Gefahr von Strahlung einschätzen zu können, die in manchen Bereichen der Industrie und der medizinischen Diagnostik zum Einsatz kommt. Von herausragender Bedeutung sind Kenntnisse über diese Mechanismen aber auch in der medizinischen Krebsforschung, welche u.a. zum Ziel hat, den Ursprung der Erkrankungen aufzuklären. Da sowohl in der Chemo- als auch in der Strahlentherapie die Schädigung des Erbguts genutzt wird, um entartete Zellen zu zerstören oder zu inaktivieren, ist die Kenntnis der zellulären Mechanismen wichtig, um die Therapie der Krebserkrankungen zu verbessern.

2.1 Entstehung von DNA-Schäden

2.1.1 Ionisierende Strahlung und ihre Wechselwirkung mit Materie

Ionisierende Strahlung (IR) besteht aus elektromagnetischen (EM)-Wellen (γ -Strahlung) oder aus Teilchen. Teilchenstrahlung kann aus α -Teilchen (α -Strahlung), Elektronen oder Positronen (β -Strahlung), Ionen oder Neutronen bestehen, die z.B. einem radioaktiven Zerfall entstammen. Die mit einer Röntgenröhre erzeugte γ -Strahlung wird als Röntgenstrahlung bezeichnet (Abb. 1). Die Röntgenröhre besteht aus einem evakuierten Behälter (der Röhre), in deren Inneren sich, meist aus Wolfram gefertigte, Elektroden

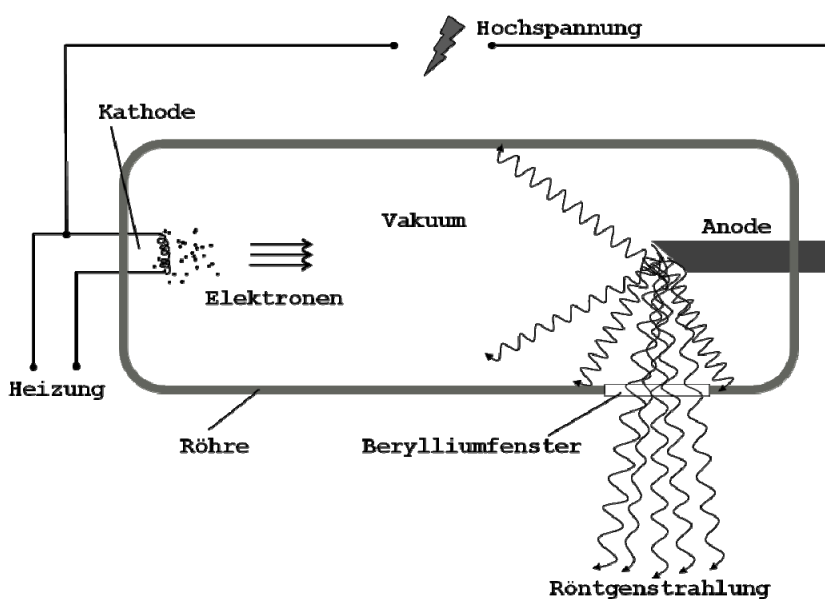


Abb. 1: Die Röntgenröhre. In einer evakuierten Röhre werden Elektronen durch eine Hochspannung beschleunigt. Werden sie an der Anode gestreut, werden Röntgenquanten frei, die durch ein Berylliumfenster die Röhre verlassen.
Verändert nach (Kiefer und Kiefer 2003)

gegenüberliegen. Die Kathode besteht dabei aus einer Wendel, die durch elektrischen Strom erhitzt wird und als Elektronenquelle dient. Liegt an den Elektroden eine Spannung an, werden die Elektronen beschleunigt und bewegen sich im Vakuum auf die Anode zu. Beim Auftreffen der Elektronen auf die Anode werden 99% der Energie als Wärme frei, weshalb die Anode aktiv gekühlt werden muss. Ca. 1% der Energie wird in Röntgenstrahlung umgesetzt, die sich aus zwei Komponenten zusammensetzt. Die Charakteristische Röntgenstrahlung entsteht durch das Herausschlagen eines Elektrons aus der Hülle eines Atoms der Anode. Die entstandene Lücke wird durch ein Elektron einer äußeren Schale aufgefüllt. Eine weiter innen liegende Schale bedeutet einen energieärmeren Zustand für das Elektron, und die Energiedifferenz wird als Röntgen-Quant frei. Je nach Anodenmaterial entsteht so ein charakteristisches Spektrum von Photonenenergien. Bei der Bremsstrahlung wird das eintreffende Elektron durch Wechselwirkung mit einem Atomkern der Anode in seiner Bahn abgelenkt. Es fliegt danach mit einer geringeren Energie weiter, und die Energiedifferenz wird als Röntgenquant frei. Das Spektrum der Bremsstrahlung weist eine homogene Verteilung auf.

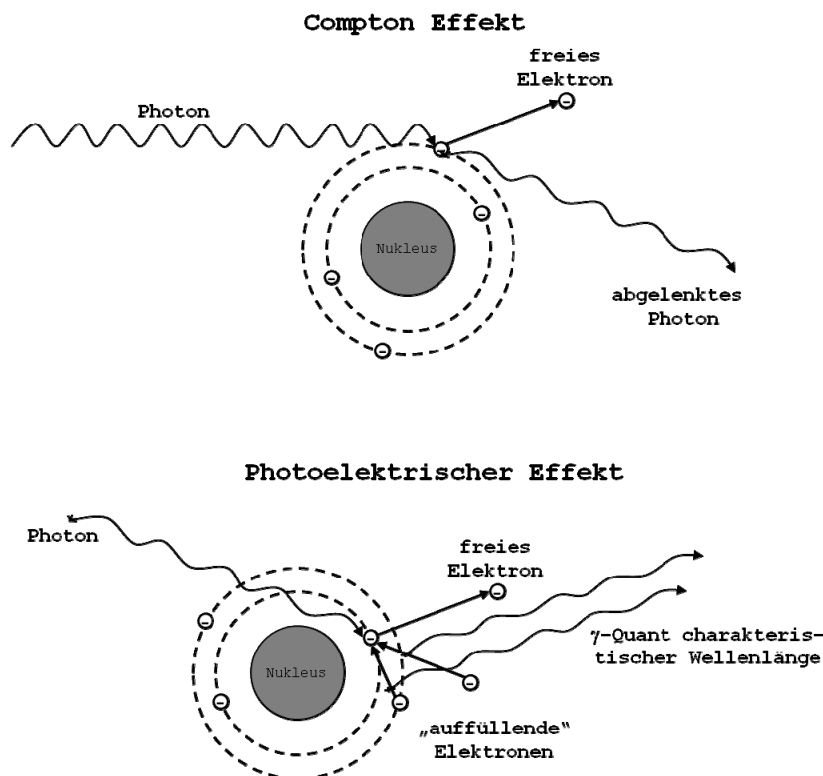


Abb. 2: Wechselwirkungen von EM-Strahlung mit Materie. Beim Compton-Effekt schlägt ein Photon hoher Energie ein Elektron aus der Atomhülle. Dabei wird es abgelenkt und die Photonen-Energie nimmt um die Bindungsenergie des Elektrons ab. Beim Photoelektrischen Effekt wird ein energieärmeres Photon von einem Elektron einer niedrigen Schale absorbiert. Das getroffene Elektron ist frei und seine kinetische Energie entspricht der Photonenenergie abzüglich der zu überwindenden Bindungsenergie. Wird die in der Atomschale entstandene Lücke aufgefüllt geht ein Elektron in einen energieärmeren Zustand über, wobei ein EM-Quant emittiert wird.

Trifft Photonenstrahlung auf Materie, so gibt es im Wesentlichen zwei Arten der Wechselwirkung. Der Photoelektrische Effekt tritt bei energieärmeren Photonen auf. Bei ihm wird die gesamte Energie des Photons von einem Elektron der inneren Schalen absorbiert. Das Elektron erhält die Photonenenergie abzüglich der eigenen Bindungsenergie als kinetische Energie und wird dadurch als sog. Sekundärelektron freigesetzt. Die entstandene Lücke in einem der inneren Schalen des absorbierenden Atoms wird durch freie Elektronen oder Elektronen der äußeren Schalen aufgefüllt. Das als Ersatz fungierende Elektron erreicht dadurch einen niedrigeren Energiezustand und die Energiedifferenz wird als EM-Strahlung charakteristischer Wellenlänge frei (Abb. 2).

Der Compton-Effekt dominiert bei hochenergetischer Röntgenstrahlung >60kV. Dabei trifft das Photon auf ein Elektron aus einer der äußeren Schalen, ohne absorbiert zu werden. Es verliert mindestens so viel Energie an das getroffene Elektron wie benötigt wird, um dessen Bindungsenergie zu überwinden. Das Photon selber wird in seiner Bahn abgelenkt und ist u.U. in der Lage, mit der verbliebenen Energie weitere Ionisationen zu verursachen. Das getroffene Elektron ist frei und kann als Sekundärelektron Ionisationen verursachen (Abb. 2).

Teilchenstrahlung ionisiert die Ziel-Moleküle direkt. Ionen sind aufgrund ihrer Ladung in der Lage im Vorbeiflug Elektronen aus den Ziel-Molekülen (z.B. Wasser oder DNA) zu ziehen und sie somit zu ionisieren. Neutronen können auf Atomkerne treffen und ein Proton aus seiner Elektronenhülle herausstoßen. Auch dies ist eine Art Ionisation. Bei jeder Ionisation nimmt die Energie des Teilchens ab und es wird langsamer bis es schließlich zum Stehen kommt.

2.1.2 Schäden an der DNA

Die biologische Wirkung von IR hängt vom *linear energy transfer* (LET [keV/μm]) ab. Der LET beschreibt die deponierte Energie pro Wegstrecke, gibt also eine Ionisationsdichte an. Einen hohen LET haben Teilchenstrahlen. Die Schädigung wird hier hauptsächlich durch direkte Interaktion zwischen Teilchen und DNA verursacht. Bei der EM-Strahlung ist der LET deutlich niedriger, und es dominiert der indirekte Strahleneffekt. Dabei interagiert die Strahlung mit anderen Molekülen der Zelle, vornehmlich mit Wasser, und es kommt zur Entstehung von Hydroxylradikalen. Diese wiederum sind hoch reaktiv und schädigen nach einer mittleren Wegstrecke von wenigen Nanometern die DNA (Hall Eric J. und Giaccia 2006).

Des Weiteren ist für die biologische Wirksamkeit die Dosis entscheidend. Die Dosis ist die Energie, die pro Masse deponiert wird. Sie wird in Gray (Gy) angegeben und hat die Einheit Joule/kg.

Direkt und indirekt verursachte Schäden an der DNA beinhalten Basenverluste und Basenveränderungen sowie Einzelstrangbrüche (ESB) und Doppelstrangbrüche (DSB). Schätzungsweise werden durch 1 Gy pro Zellkern 1000-2000 Basenschäden, 600-1000 ESBs sowie 16-40 DSBs induziert (Lobrich et al. 1995, Ward 1988). Die ersten drei Schadensarten sind zwar ungleich häufiger, jedoch stellen sie keine ernsthafte Bedrohung für die Zelle dar. Sie werden schnell und effizient über Basenexzisionsreparatur (BER) beseitigt (Ward 1995). Hydroxylradikale können jedoch innerhalb eines Bereichs weniger Nanometer einen mehrfachen Schaden, eine sog. *locally multiple damaged site* (LMDS), verursachen. Mehrere Schäden innerhalb 20 bp zählt man zu den komplexen DNA-Schäden. Auf diese Weise kann auch ein DSB entstehen, wenn sich zwei ESBs im Abstand von bis zu 12 bp gegenüber liegen (Hall Eric J. und Giaccia 2006, Ward 1985).

Der DSB gehört zu den schwerwiegendsten Läsionen für eine Zelle, da durch die Durchtrennung beider Stränge die strukturelle Integrität des Genoms bedroht ist. Spontan treten ca. 10 DSBs pro Tag und Zelle auf. Endogene Ursache dafür sind meist reaktive Sauerstoffspezies, die in der Atmungskette anfallen (Haber 2000, Ma et al. 2005), aber auch in der Meiose (crossing over) und bei der *variable (diversity) joining* (V(D)J)-Rekombination werden DSBs von körpereigenen Enzymen erzeugt, um die Rekombination während der Reifeteilung¹ bzw. der Antikörper-Generierung zu erhöhen (Gellert 2002, Hall A. G. und Tilby 1992). Als exogene Verursacher von DSBs sind neben der IR Chemikalien zu nennen. Diese beiden Wege der Schädigung werden auch in der Medizin als Strahlen-, bzw. Chemotherapie von Krebs eingesetzt. Durch Strahlung entstandene DSBs weisen oft Veränderungen an den Enden des DNA-Rückgrats auf. Häufige Schäden sind der Verlust der 3'-OH Gruppe oder des 5'-Phosphats, möglich sind auch Veränderungen des Zuckers. Solche zusätzlichen Schäden erfordern die Prozessierung des DSBs und die Ersetzung der betreffenden Gruppen bevor eine Reparatur stattfinden kann (Hall Eric J. und Giaccia 2006, Henner et al. 1983). Die Folgen eines nicht- oder falsch reparierten DSBs sind Mutationen, chromosomale Aberrationen und im schlimmsten Falle die Entartung der Zelle (Zhang et al. 2007). Dementsprechend erfolgen die Reaktionen der Zelle auf DSBs gestaffelt. Nach der Detektion werden Reparaturprozesse

initiiert. Parallel wird die Zellzyklus-Progression verlangsamt oder angehalten, um Zeit für eine korrekte Reparatur zur Verfügung zu stellen. Bei entsprechend starker Schädigung unterläuft die Zelle Apoptose, damit sich stattgefunden Mutationen nicht manifestieren können.

2.2 Zellzyklus und Zellzyklusregulation

Jedes Wachstum von Gewebe beruht auf Zellteilung, und der Zellzyklus ist eine Abfolge von Schritten, welche die Zelle unternimmt, um sich teilen zu können. Innerhalb des Zellzyklus wird die Mitose, in der die eigentliche Zellteilung abläuft, der Interphase gegenübergestellt, welche die Phasen zwischen zwei Mitosen und somit den Großteil des Zellzyklus einnimmt (Abb. 3).

Direkt nach einer Zellteilung befindet sich die Zelle in der *gap1*- oder G1-Phase. Der Name ist historisch bedingt. Da man die Zeit zwischen zwei Zellteilungen beobachtete, nannte man sie engl. *gap* für „Lücke“. In der G1-Phase werden Zellbestandteile wie Organellen und Zytosol produziert, wodurch die Zelle an Volumen zunimmt. Parallel bereitet sich die Zelle bereits auf die Synthese-Phase (S-Phase) vor, in der die DNA im Zellkern repliziert wird. Nach der S-Phase bestehen die Chromosomen aus zwei identischen Chromatiden. Nach der S- folgt die G2-Phase, in der vor allem Proteinbiosynthese stattfindet um die Zelle auf die bevorstehende Mitose vorzubereiten (Sisken und Morasca 1965). Während der Mitose wird das genetische Material korrekt auf die beiden Tochterzellen aufgeteilt, und die Zytoplasmamassen werden durch Abschnürung voneinander getrennt.

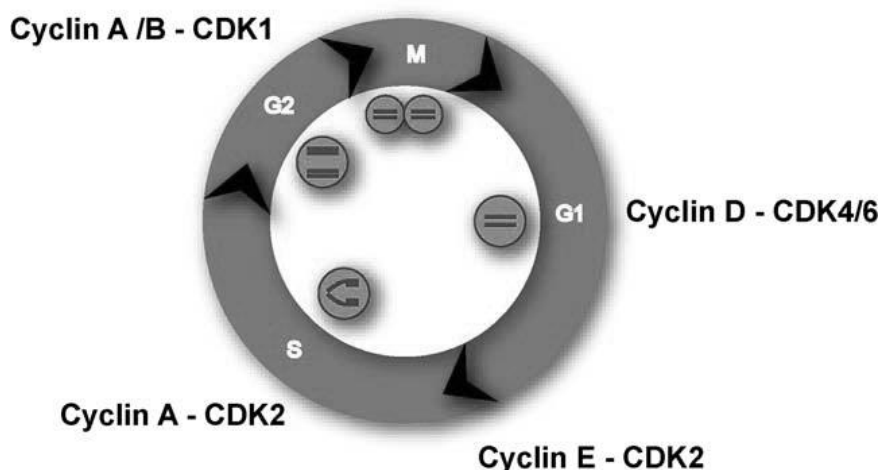


Abb. 3: Schematische Darstellung der Zellzyklus-Regulation. Innerhalb des Kreises ist der jeweilige Zustand angedeutet, in dem die DNA vorliegt. Außerhalb des Kreises sind die in der jeweiligen Phase vorherrschenden Cyclin-Cdk-Komplexe aufgeführt. Nach (Warmerdam und Kanaar 2010)

Obwohl die Mitose verglichen mit der Interphase sehr kurz ist, wird ihr komplexer Ablauf in mindestens 4 Phasen unterteilt. In der Prophase trennen sich die Zellpole (Zentrosomen), so dass sie sich in der Zelle gegenüberstehen. Des Weiteren wird die DNA auf die Trennung vorbereitet. Die Chromosomen kondensieren und werden zu den anfärbbaren Körpern, als die sie einst entdeckt wurden. Die Kernhülle

wird abgebaut, und die Chromosomen sammeln sich in der Zellmitte. In der Metaphase richten sich die Chromosomen in der Äquatorialebene zwischen den Zentrosomen aus. Der Spindelapparat hat sich ausgehend von den Zentrosomen gebildet und bindet nun von beiden Seiten an die Kinetochoren der Chromosomen. Als Anaphase wird die kurze Phase des Verkürzens der Spindelfasern bezeichnet. Als Folge werden die Schwesterchromatiden getrennt und in Richtung der beiden Zentrosomen gezogen. Die letzte Phase der Mitose wird als Telophase bezeichnet. In der Telophase bilden sich zunächst die Kernhüllen beider Tochterzellen aus, und die DNA beginnt zu dekondensieren. Mit der Trennung der Zytoplasma-Massen, der Zytokinese, gilt die Mitose als abgeschlossen (Campbell und Reece 2009, Flemming 1879).

Zellen können den Zellzyklus auch unterbrechen. Dazu gehen sie in einen G0 genannten Zustand über und setzen die Proliferation aus. Durch entsprechende Stimuli kann dieser Zustand jedoch wieder aufgehoben werden, und die Zelle tritt in G1 wieder in den Zellzyklus ein (Denhardt et al. 1986).

Sowohl die Abfolge der Zellzyklus-Phasen als auch die Dynamik innerhalb einer Phase wird durch eine Klasse von Proteinen, den Cyklinen reguliert. Im Komplex mit den *cyclin dependent kinases* (Cdks) steuern die Cykline die Einleitung, den Fortschritt und die Beendigung jeder Zellzyklusphase (Pines 1995). Dabei sind die Cdks katalytische, fortwährend vorhandene Untereinheiten und die Cykline fungieren durch Zellzyklusphasen-spezifische Synthese, Aktivierung und Lokalisation als regulatorische Untereinheiten. (Morgan D.O. 2007). Für die Entdeckung der Zellzyklusregulation über Cykline und Cdks erhielten Hartwell, Hunt und Nurse 2001 den Nobelpreis für Medizin, dennoch sind viele Details der Zellzyklusregulation bis heute ungeklärt.

Neben der Regulation über die Transkription bzw. Lokalisation der Cykline werden Cdks durch Änderungen des Phosphorylierungs-Musters im sog. *activation-loop* der Kinase-Domäne reguliert. Aktivierende Phosphorylierungen werden dort von den *Cdk activating kinases* (CAKs) durchgeführt. Inaktivierende Phosphorylierungen finden auch N-Terminal u. a. durch die Kinasen Wee1 und Myt1 statt. Entfernt werden inaktivierende Phosphorylierungen durch Phosphatasen der Cdc25-Familie. N-Terminal binden auch Cdk-Inhibitoren, kleine Proteine der Ink- oder Cip-Familie, deren Vorhandensein über Transkription kontrolliert wird (Lundgren et al. 1991, Parker und Piwnica-Worms 1992). Der Phosphorylierungsstatus eines Cdks beeinflusst nicht nur direkt seine Aktivität, sondern entscheidet auch über die subzelluläre Lokalisation des Komplexes und wirkt somit regulierend (Morgan D. O. 1995).

Durch die beschriebenen Mechanismen wirken unterschiedliche Cyklin-Cdk-Komplexe in unterschiedlichen Zellzyklus-Phasen (Abb. 3). In G1 interagiert, abhängig vom Zelltyp, CyklinD mit Cdk4 oder Cdk6, was u.a. eine Hochregulierung von CyklinE bewirkt. Gegen Ende der G1-Phase wird der CyklinE/Cdk2-Komplex durch Veränderung des Phosphorylierungsmusters aktiviert, was den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase steuert (Koff et al. 1992). S-Phase-Gene werden transkribiert und die Replikation eingeleitet (Jackman et al. 2002). In der S-Phase wird CyklinA hochreguliert. Es bildet einen Komplex mit Cdk2, der Kinase, die für die Initiierung und Fortsetzung der Replikation verantwortlich ist.

Gegen Ende der S-Phase wird verstärkt CyklinB gebildet (Morgan D.O. 2007). Sowohl CyklinA als auch CyklinB werden in G2 von Cdk1 gebunden, und dies führt letztendlich zur Initiierung der Mitose (Boonstra 2003, Weinberg 1995).

Zwei Phasen des Zellzyklus sind empfindlicher gegenüber DNA-Schäden und dabei insbesondere gegenüber DSBs. In der S-Phase stören Schäden den korrekten Ablauf der Replikation. Geschädigte Basen können fehlerhaft repliziert werden und führen so zu Punktmutationen. Einzelstrangbrüche (*single strand breaks*, SSBs) können zum Kollaps der Replikationsgabel führen und in der Folge zu DSBs (Nikolova et al. 2010). Trifft die Replikationsgabel auf einen DSB kommt die Replikationsgabel zum stehen. Evtl. manifestiert sich der DSB ebenfalls im Schwesterchromatid, was zu einem Chromosomenbruch und zum Verlust genetischen Materials in der Mitose führen kann. In manchen Fällen kann ein DSB auch zu einer unvollständigen Replikation des Chromatids führen (*one ended break*) (Helleday et al. 2007). In die Mitose gelangende DSBs können zur nicht korrekten Aufteilung der Chromosomen führen. Entstandene azentrischer Fragmente werden nicht auf die Tochterzellen verteilt, bewirken den Verlust genetischen Materials und führen so zum Entarten oder Absterben der Zelle. Diese Prozesse können zu genetischer Instabilität und Krebs führen (Arnaudeau et al. 2001, Lengauer et al. 1998).

Als beobachtet wurde, dass die Zelle nach der Induktion von DSBs aufhört im Zellzyklus voran zu schreiten, stellte man sich diesen Mechanismus als eine Reihe von Kontrollpunkten (*checkpoints*) im Zellzyklus vor, an denen die Zelle den Abschluss vorheriger Phasen überprüft, bevor sie mit der nächsten Phase beginnt (Weinert und Hartwell 1988). Später, nach besserem Verständnis vor allem auch des Intra-S-Checkpoints, wurden Checkpoints als Prozesse verstanden, die das Fortschreiten im Zellzyklus verlangsamen, um den korrekten Ablauf von Zellzyklusereignissen zu gewährleisten (siehe auch 2.3 und 2.4)(Nasmyth 1996).

2.2.1 Der G1/S- und Intra S-Checkpoint

Nach dem Auftreten von DSBs in G1 wird der G1/S-Checkpoint aktiviert, um den Start der Replikation zu verzögern. Zur Induktion des G1/S-Arrests ist ein langsamer Mechanismus der u. a. über eine transkriptionelle Regulierung wirkt gut beschrieben, parallel läuft aber immer auch eine schnelle, über Phosphorylierungen und Ubiquitinylierungen operierende Signalkaskade zur Induktion des Checkpoints ab. Detektiert wird der DSB bei beiden Wegen über den Schadenssensor *Ataxia Telangiectasia mutated* (ATM). Für die schnelle Antwort phosphoryliert ATM die Checkpoint-Kinase Chk2. Chk2 phosphoryliert Cdc25A, woraufhin Cdc25A der Ubiquitinylierung und dem proteasomalen Abbau zugeführt wird. Für den G1/S-Übergang und den Beginn der Replikation ist die Entfernung inhibierender Phosphatgruppen am CyklinE/Cdk2-Komplex durch die Phosphatase Cdc25A notwendig. Durch den Abbau von Cdc25A kommt es zu einer Anreicherung des inaktiven CyklinE/Cdk2-Komplexes, und die Zelle bleibt am G1/S-Übergang stehen (Busino et al. 2004, Mailand et al. 2000). Der langsamere einsetzende aber wohl länger anhaltende Arrest läuft über den Transkriptionsfaktor p53. ATM phosphoryliert nach Detektion eines DSBs p53 am

Serin15, was dessen Export aus dem Zellkern entgegenwirkt (Banin et al. 1998). Des Weiteren verhindert eine Serin20-Phosphorylierung durch Chk2 die Ubiquitylierung durch Mdm2 und den folgenden Abbau (Hirao et al. 2000). Das somit im Zellkern angereicherte aktive p53 wirkt als Transkriptionsfaktor für den Cdk2-Inhibitor p21, und es kommt zum Zellzyklusarrest (Giacinti und Giordano 2006). Die beiden Mechanismen, der schnelle und der langsame Zellzyklus-Arrest werden als sich ergänzende Wege diskutiert (Bartek und Lukas 2001).

Im Gegensatz zum G1/S-Übergang führen während der S-Phase auftretende DSBs nicht zu einem Anhalten der Zellen im Zellzyklus, sondern nur zu einer Verzögerung der Replikation. Hierbei wurden ebenfalls mehrere Wege beschrieben (Bartek et al. 2004, Falck et al. 2002). DSBs, die unabhängig von der Replikation auftreten, aktivieren die gleiche Signalkaskade wie in der schnellen DSB-Schadensantwort in G1. Letztlich bleibt die Aktivierung der Cdk2/CyklinE- und CyklinA-Komplexe durch Cdc25B aus. Der Intra-S-Checkpoint wirkt über die Inhibierung von Replikationsgabeln und *origins of replication* (ORIs), wodurch die Replikation zum Erliegen kommt, bis die DSBs repariert sind. Treffen Replikationsgabeln auf schadhafte DNA und werden blockiert oder herrscht ein Mangel an Nukleotiden, entstehen einzelsträngige DNA-Bereiche, die von *Ataxia Telangiectasia and Rad3 related* (ATR) im Komplex mit *ATR interacting protein* (ATRIP) detektiert werden. Diese Kinasen aktivieren Chk1, welches analog zu Chk2 den Abbau von Cdc25B bewirkt (Shechter et al. 2004). Über diese gut charakterisierten Mechanismen hinaus werden der MRN (MRE11-RAD50-NBS1)-Komplex, BRCA1, SMC1, 53BP1 und MDC1 mit der Schadensantwort während der S-Phase in Verbindung gebracht. So weisen Zellen mit Defekten in diesen Proteinen den *radio resistant DNA synthesis* (RDS)-Phänotyp auf (Falck et al. 2002, Goldberg et al. 2003, Maser et al. 2001, Wang B. et al. 2002, Xu et al. 2001, Yazdi et al. 2002).

2.2.2 Der G2/M- und der mitotische Checkpoint

Der G2/M-Checkpoint soll verhindern, dass Zellen mit DSBs in die Mitose gelangen. Im Prinzip erfolgt die Aktivierung des G2/M-Checkpoints über die gleichen zwei Wege wie in G1, nur kontrolliert in G2 der Cdk2/CyklinB-Komplex den Übergang in die und den Fortschritt durch die Mitose. Cdk2/CyklinB wird in diesem Zusammenhang auch der *mitosis promoting factor* (MPF) genannt. Dephosphoryliert durch Cdc25C wird der MPF aktiv und phosphoryliert mehrere Substrate, die für den Übergang von der G2-Phase in die Mitose, aber auch für spätere Phasen der Mitose benötigt werden. So wird z.B. durch Phosphorylierung von Serinresten der Kernlamine der Zerfall der Kernhülle eingeleitet (Heald und McKeon 1990). Desweiteren fördert eine Phosphorylierung des Histon 1 die Kondensation der Chromosomen (Ookata et al. 1993). Durch Phosphorylierung von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) wird der Spindelfaserapparat-Aufbau, der Zerfall des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Golgi-Apparats beeinflusst (Jackman et al. 1995, Ookata et al. 1993, Thyberg und Moskalewski 1999, Yamashiro und

Matsumura 1991). Es findet auch eine Aktivierung des *anaphase promoting complex* (APC) statt, der später an der korrekten Trennung der Chromatiden in der Anaphase beteiligt ist.

Treten in der DNA DSBs auf, werden diese durch den DSB-Sensor ATM detektiert. Sind einzelsträngige DNA-Bereiche vorhanden bzw. treten solche Bereiche während der Reparatur von DSBs auf, aktiviert dies ATR. ATM und ATR aktivieren den G2/M-Checkpoint, indem sie die Checkpointkinasen Chk2 und Chk1 phosphorylieren (Abb. 4). Die Checkpointkinasen wiederum phosphorylieren Cdc25C und Wee1. Cdc25C bindet an das 14-3-3-Protein und wird aus dem Zellkern transportiert. Wee1 phosphoryliert Cdk2 am N-Terminus. Beides hat inaktivierende Wirkung auf den MPF, und die Zelle initiiert keine Mitose (Donzelli und Draetta 2003, Loffler et al. 2007, Peng et al. 1997, Zhao et al. 2002). Ähnlich zum G1/S-Checkpoint kann durch die Checkpointkinasen auch p53 phosphoryliert werden. Diese Signalkaskade ist aufgrund der Beteiligung der Transkription langsamer, wird aber als länger anhaltender G2/M-Checkpoint-Arrest diskutiert (Dulic et al. 1998, Hermeking et al. 1997, Porter und Donoghue 2003).

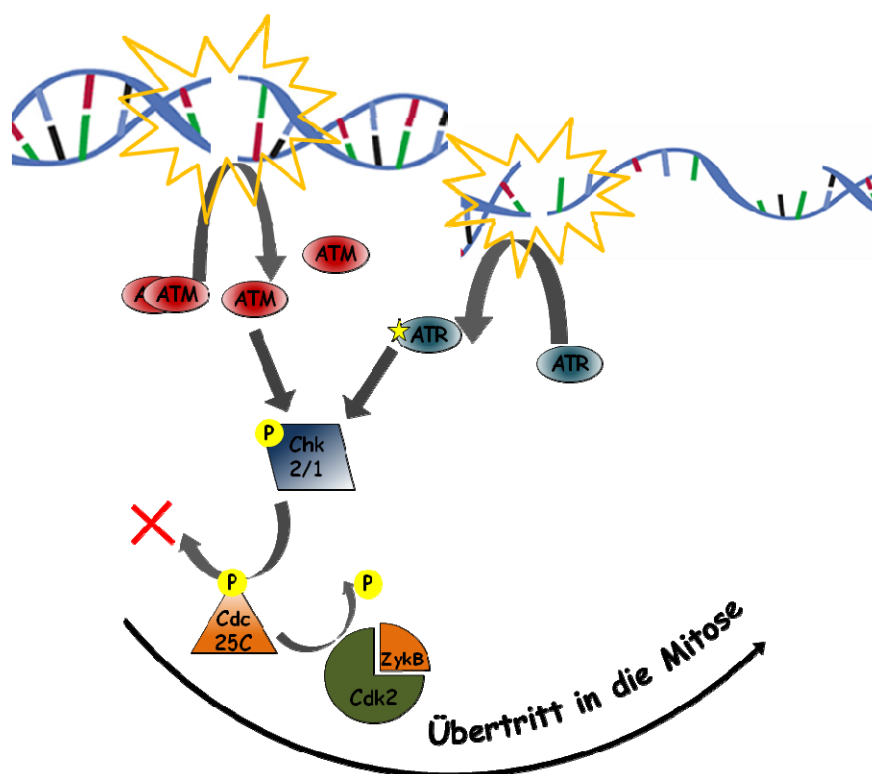


Abb. 4: Auswirkung von DSBs auf den G2/M-Übergang. ATM-monomerisierung an DSBs bzw. ATR-Aktivierung an resektierten DNA-Bereichen führt zur Phosphorylierung von Chk2 und Chk1. Die Checkpoint-Kinasen bewirken den Abbau von Cdc25C. Ohne Cdc25C wird der Cdk2/ZykB-Komplex nicht mehr dephosphoryliert und verbleibt inaktiv. Die Zelle verbleibt in der G2-Phase.

Die Aufhebung des G2/M-Checkpoints findet einerseits statt, wenn Reparatur stattgefunden hat. Das ATM/ATR-Signalling wird dann schwächer und ist nicht mehr in der Lage, die Aktivierung des Cdk2/CykB-Komplexes zu inhibieren. Darüber hinaus gibt es aber auch als *Adaptation* bezeichnete Prozesse, die den Checkpoint-Arrest verkürzen können (Syljuasen 2007). Die *polo like kinase 1* (PLK1) greift in das Gleichgewicht aktivierender und inaktivierender Phosphorylierungen am MPF ein, indem es Wee1 phosphoryliert und damit dem proteosomalen Abbau zuführt. Somit verhindert Plk1 inhibierende

Phosphorylierungen am MPF (van Vugt et al. 2004). Eine ähnliche Rolle spielt Plk1 nach replikativem Stress in der S-Phase. Inhibiert man die Replikation, arretieren die betroffenen Zellen zunächst. Chk1 wird in diesen Zellen u. a. über Claspin aktiviert. Plk1 wird nach einer gewissen Zeit des Arrests aktiv und phosphoryliert Claspin. Im Anschluss wird Claspin von der 3/4TrCP-SCF Ubiquitin-Ligase ubiquitinyliert und proteosomal abgebaut. Eine Chk1-Phosphorylierung über Claspin bleibt aus, und die Zelle tritt wieder in den Zellzyklus ein (Mailand et al. 2006). Diese, bestimmt aber auch weitere Mechanismen haben zur Folge, dass der G2/M-Checkpoint als wenig stringent gilt. Auch kann beim G2/M-Checkpoint ein Schwellenwert beobachtet werden. Erst ab einer gewissen Anzahl von DSBs wird ein Checkpoint am G2/M-Übergang beobachtet. Strahlungsdosen, die weniger als 15 DSBs induzieren, können keinen deutlichen Effekt auf den G2/M-Checkpoint der Zellen erzielen. Werden die Zellen mit höheren Dosen bestrahlt arretieren sie und heben den Checkpoint auf, sobald die DSB-Anzahl pro G2-Zelle unter den Schwellenwert fällt (Deckbar et al. 2007).

Der Induktionsmechanismus des mitotischen Checkpoints unterscheidet sich wesentlich von dem anderer Zellzyklusphasen. Im Unterschied zu G1-, S- und G2-Phase ist hier nicht das Schadenssignal maßgeblich sondern die Anordnung der Chromosomen zwischen den Zellpolen. Ohne eine korrekte Anheftung der Spindelfasern an die Kinetochoren der Chromosomen bleibt die Zelle am Übergang zur Anaphase stehen. Erst wenn alle Chromosomen korrekt in der Äquatorialebene zwischen den Zellpolen angeordnet sind und die Anheftung der Spindelfasern erfolgreich war, kann die Anaphase mit der Trennung der Schwesterchromatiden erfolgen (Cahill et al. 1998, Clarke und Gimenez-Abian 2000). Frei bleibende Kinetochoren bewirken über mehrere Zwischenstufen eine Ubiquitinylierung von CyklinB, welches als Teil des MPF für den Start der Anaphase benötigt wird (Musacchio und Salmon 2007).

2.3 Schadenserkennung, Foci-Entstehung und Signalverstärkung (die primäre Schadensantwort)

Der DSB ist ein lokales aber sehr gefährliches Ereignis, da er zum Verlust genetischen Materials, bei Fehlreparatur zu Translokationen und schließlich zum Zelltod führen kann. Als Reaktion auf einen DSB ist eine schnelle Weiterleitung des Schadenssignals wichtig. Dazu haben sich Signalkaskaden entwickelt, die den Schaden erkennen und das Signal amplifizieren. Die Signal-Amplifikation ist vor allem für die Induktion eines Zellzyklusarrests wichtig, wodurch Zeit für die Reparatur zur Verfügung gestellt wird. Die Signal-Verstärkung führt außerdem zur Rekrutierung einer großen Anzahl Proteine an den Bruch und an die flankierenden DNA-Bereiche. So werden z.B. auch weitreichende Chromatin-Modifikationen durchgeführt, welche den Zugang zur DNA vereinfachen und Reparaturvorgänge ermöglichen.

Wird die Zelle geschädigt, akkumulieren Proteine am Schadensort. Immunfluoreszent gefärbt kann man diese Ansammlungen im Mikroskop sehen bzw. quantifizieren. Diese Orte der Reparatur nennt man Schadensfoci oder auch IRIF (*irradiation induced foci*) und ihre Anzahl gibt Auskunft über Schadenshöhe und Reparaturgeschwindigkeit einer Zelle (Lobrich et al. 2010, Rothkamm und Lobrich 2003).

Als Sensor des DSBs wird der MRN-Komplex gesehen. Der Komplex bindet am Bruchende und initiiert durch mehrere Wechselwirkungen die Rekrutierung der ersten Proteine zum DSB. NBS1 trägt zur

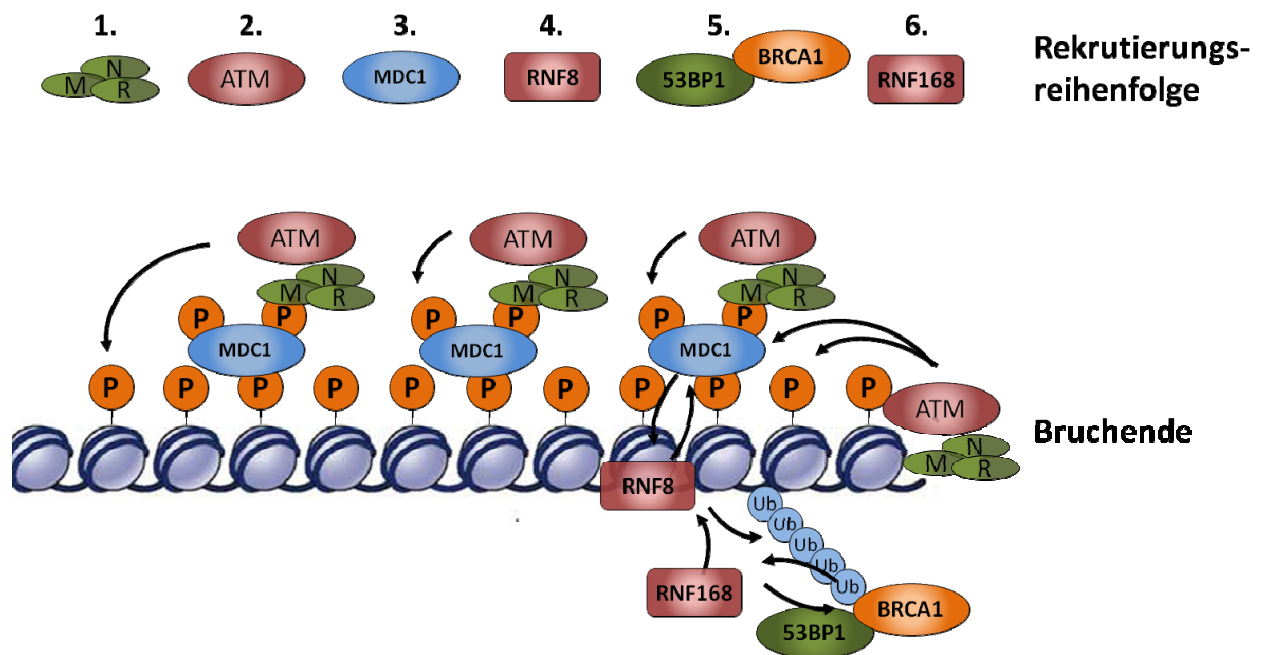


Abb. 5: Erste Schritte in der DNA-Schadensantwort. 1. Der MRN-Komplex detektiert das Bruchende der um Nukleosomen gewundenen DNA und bindet. 2. ATM wird rekrutiert, aktiviert und phosphoryliert seinerseits H2AX. 3. MDC1 wird über den MRN-Komplex rekrutiert und interagiert mit γ H2AX. MDC1/ γ H2AX rekrutieren weiteres MRN und ATM und sorgen somit für eine positive Rückkopplung. 4. MDC1 rekrutiert die Ubiquitin-Ligase RNF8, die vor allem γ H2AX ubiquitinyliert. 5. 53BP1 und BRCA1 binden direkt oder vermittelt an ubiquitinyliertes γ H2AX. 6. RNF168 wird in Abhängigkeit von 53BP1 und BRCA1 gebunden und trägt seinerseits zur Stabilisierung von RNF8 und dessen Ubiquitinylierungen bei. Darstellung vereinfacht nach (van Attikum und Gasser 2009)

Aktivierung von ATM bei. ATM als Mitglied der PIKK (*phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases*) Proteinfamilie phosphoryliert Serin- und Threonin-Reste und ist zusammen mit ATR und DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*) die Kinase, die eine zentrale Rolle in der Signalkaskade nach DNA-Schädigung einnimmt. Das inaktive ATM-Dimer bindet an NBS1, autophosphoryliert sich am Serin 1981 und zerfällt in Monomere, welche die aktive Form von ATM darstellen (Bakkenist und Kastan 2003). Diese Aktivierung erfolgt jedoch auch unabhängig von MRN. Zu den Substraten von Phospho-ATM gehören die Checkpointkinasen Chk1 und Chk2, H2AX und der Tumorsuppressor p53, womit es an den DNA-Schadensantworten Zellzyklus-Reaktion, DNA-Reparatur und Apoptose beteiligt ist (siehe 2.2). Eine weitere wichtige Interaktion den MRN-Komplexes ist die Bindung von MDC1, welches im Zentrum fast aller Rekrutierungen *downstream* von MRN steht (Goldberg et al. 2003, Stewart et al. 2003). MDC1 bindet

N-terminal an die FHA-Domäne von NBS1. Dazu muss eine doppelte Phosphorylierung im N-Terminus von MDC1 vorliegen (*SDT-motif*), die wahrscheinlich von Phospho-ATM durchgeführt wird (Lloyd et al. 2009, So et al. 2009).

Aktiviertes ATM, welches in hoher Konzentration um den DSB herum vorliegt, phosphoryliert das Histon H2AX. H2AX ist eine Variante von H2A und stellt im Menschen ca. 10% der 2A-Histone dar. H2AX wird von Mitgliedern der PIKK Familie am Serin139 zu γ H2AX phosphoryliert (Celeste et al. 2002). Phosphospezifische Antikörper gegen γ H2AX sind ein etablierter DSB-Schadensmarker (Lobrich et al. 2010).

γ H2AX bindet entlang der den DSB flankierenden DNA-Bereiche MDC1 über dessen BRCT (BRCA1 C-terminal)-Domäne. Gebundenes MDC1 wird als Zentrum der weiteren Signalamplifikation und Rekrutierung weiterer Faktoren diskutiert (Kouzarides 2007, Lou et al. 2006, Rodriguez et al. 2003, Stucki et al. 2005). Einerseits stabilisiert MDC1 durch seine Bindung die Phosphorylierung von H2AX, andererseits wurde gezeigt, dass die MDC1- γ H2AX-Interaktion eine Kettenreaktion ständiger Rekrutierungen von Reparaturfaktoren zum DSB auslöst. Phosphoryliertes MDC1 bindet MRN, MRN rekrutiert und aktiviert ATM und ATM phosphoryliert wiederum das umliegende H2AX. Über diese Reaktionsschleife entsteht eine H2AX-Phosphorylierung und eine Rekrutierung von Reparatur-Proteinen an den angrenzenden DNA-Bereichen, die als ein Abschnitt von bis zu 2 Mbp beschrieben werden (Rogakou et al. 1999, Stucki und Jackson 2006).

MDC1 stellt auch die Brücke zur Rekrutierung einer zweiten „Welle“ von Reparaturfaktoren dar. RNF8 wird als erste von mehreren Ubiquitin-Ligasen zum DSB rekrutiert. RNF8 bindet früh über seine FHA-Domäne an den N-Terminus von MDC1 und ubiquitinyliert γ H2AX (Mailand et al. 2007). Diese Ubiquitinylierung beeinflusst wahrscheinlich die Chromatinstruktur und erleichtert darüber die DNA-Prozessierung oder -Reparatur. Die RNF8-Aktivität am DSB ist gleichzeitig auch die Voraussetzung für die Rekrutierung weiterer Ubiquitin-Ligasen wie RNF168 und HERC2 zum DSB. RNF168 bindet über *ubiquitin interacting domains* (UIMs) an die primäre, RNF8 abhängige (Poly)-Ubiquitinylierung am γ H2AX und stabilisiert bzw. erweitert diese (Doil et al. 2009, Stewart et al. 2009). Die Kombination von Ubiquitin-Bindung und Ubiquitin-Ligase-Aktivität lässt hier einen selbstverstärkenden Mechanismus vermuten. HERC2 interagiert mit RNF8 und vermittelt die Interaktion zwischen RNF8 und der E2-Ligase UBC13 (Bekker-Jensen et al. 2010). UBC13 ermöglicht eine Verknüpfung der Ubiquitin-Ketten über Lysin63. Die K63-Verknüpfung ist charakteristisch für schadensassoziierte Poly-Ubiquitinylierungen (Huen et al. 2010). Ubiquitinylierte Histone sind Bindungspartner für weitere Reparaturfaktoren wie *breast cancer1* (BRCA1) und *p53 binding protein 1* (53BP1), womit die effiziente Rekrutierung dieser Faktoren von der Aktivität der Ubiquitin-Ligasen abhängt. BRCA1 bindet über den Komplex mit BRCA1 A an Ubiquitin (Huen et al. 2010), wobei die UIMs in BRCA1 A spezifisch für K63 verknüpfte Poly-Ubiquitinketten sind und somit schadensspezifisch (Sato et al. 2009, Sims und Cohen 2009).

Über den Mechanismus der 53BP1-Rekrutierung ist wenig bekannt. Entweder hat 53BP1 bisher unbekannte Bindungspartner, welche die Verbindung zu den Histonen vermitteln, oder 53BP1 enthält selber UIMs. Bekannt ist die Interaktion zwischen den 53BP1-TUDOR-Domänen und Methylierungsstellen in H3 und H4, wobei H4K20me *in vivo* die größere Bedeutung zuzukommen scheint (Huen et al. 2010). Da diese Methylierungen jedoch nicht schadensspezifisch durchgeführt werden sondern immer vorhanden sind, werden durch Ubiquitinylierungen verursachte Chromatinstruktur-Veränderungen diskutiert, welche die Methylierungsstellen für 53BP1 besser zugänglich machen könnten (Yang und Mizzen 2009). Die frühe Schadensantwort und die Foci-Ausbildung ist ständiger Gegenstand der Forschung, und so sind auch aktuell manche Faktoren zwar entdeckt, ihre Regulation und Bedeutung aber noch nicht vollständig geklärt. Entsprechend der Ubiquitin-Ligasen kann man für die Deubiquitylasen (DUBs) von γ H2AX eine große regulatorische Bedeutung vermuten. Mehrere bekannte DUBs können γ H2AX deubiquitinylieren. Dabei ist USP3 bisher die einzige, für die eine Beeinflussung der Foci-Ausbildung nachgewiesen wurde (Doil et al. 2009). BRCC36, eine Komponente des BRCA1 A-Komplexes, ist ebenfalls eine DUB, wobei ihre Bedeutung jedoch noch unklar ist (Shao et al. 2009). Neben der Phosphorylierung und der Ubiquitinylierung ist die SUMOylierung eine posttranslationale Modifikation, die eine regulatorische Rolle in der DSB-Reparatur innehat. So wurde nachgewiesen, dass die Akkumulation von BRCA1 und 53BP1 neben den oben beschriebenen Mechanismen auch von der Aktivität der SUMOylasen PIAS1 und PIAS4 abhängt (Galanty et al. 2009, Morris et al. 2009). Ähnlich zur Ubiquitinylierung scheint hier eine weitere Ebene der Regulation zu existieren, die jedoch bisher kaum untersucht ist.

2.4 Reparaturwege von DSBs

Die Aktivierung der Kinasen der PIKK-Familie, γ H2AX und MDC1 sind von zentraler Bedeutung für die Signalamplifikation und die Regulation des Checkpoint-Arrests. Für die Reparatur fast aller Brüche sind diese Faktoren aber von untergeordneter Rolle. Zelllinien, welche Mutationen in den entsprechenden Genen aufweisen, zeigen nur milde Reparaturdefekte. Abhängig vom vorliegenden Schaden können unterschiedliche Wege der Doppelstrangbruch-Reparatur benutzt werden, und die Wahl des Reparaturweges wird durchaus von den im IRIF vorhandenen Faktoren reguliert (Bunting et al. 2010).

2.4.1 Non Homologous End Joining (NHEJ)

Vor Allem in der G1- aber auch in der G2-Phase ist das NHEJ im Menschen der dominierende Reparaturweg, welcher im Wesentlichen über die einfache Verknüpfung der Bruchenden abläuft. Beim NHEJ bindet zunächst das Ku70/Ku80-Heterodimer an die Bruchenden (Lieber et al. 2003). Es bildet eine ringförmige Struktur und „stülpt“ sich über die DNA-Enden. Anschließend bindet die DNA-PKcs, woraufhin der gesamte Protein-Komplex DNA-PK genannt wird (Abb. 6). Nach der Bindung findet eine

Konformationsänderung des Proteinkomplexes statt und die Bruchenden werden zugänglich für Ligasen und weitere Faktoren (XRCC4, XLF, DNA-LigaseIV) (Ahnesorg et al. 2006, Lees-Miller und Meek 2003, Wilson et al. 1997). Das NHEJ ist prinzipiell fehlerbehaftet. Es können falsche Bruchenden verknüpft werden und Basenpaare verloren gehen, wenn die Bruchenden vor der Ligation prozessiert werden müssen.

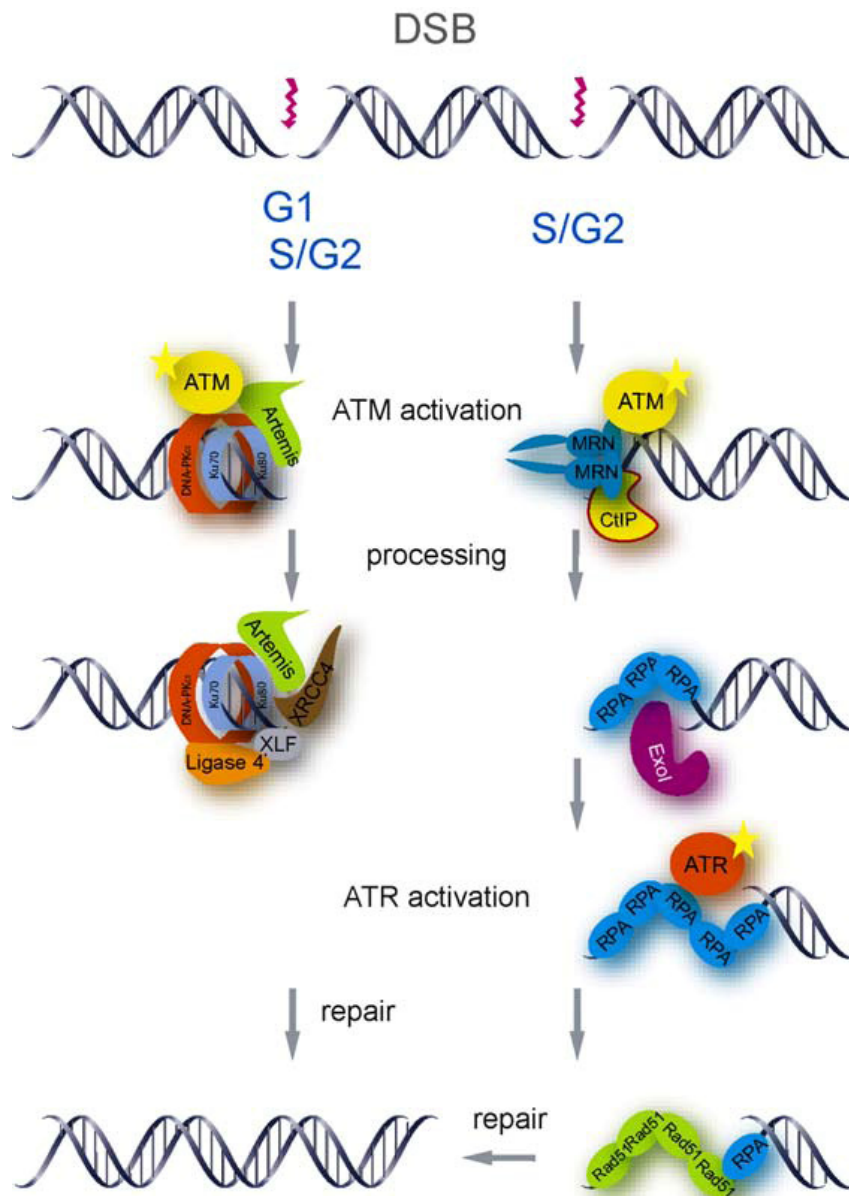


Abb. 6: Vergleich zwischen ATM- und ATR-Aktivierung am Doppelstrangbruch. Beim NHEJ führt die Bindung von MRN am Bruchende zu einer initialen ATM-Aktivierung, die im Folgenden durch eine positive Rückkopplung verstärkt wird. Bei der HR wird nach der initialen ATM-Aktivierung resektiert. Die über RPA stabilisierte ssDNA bindet ATR und aktiviert dieses. Aus (Warmerdam und Kanaar 2010).

2.4.2 Homologe Rekombination (HR)

Bei der HR wird ein homologer DNA-Bereich als Matrize für die fehlerfreie Reparatur eines DSBs herangezogen. Beim Menschen ist die HR auf die Meiose, die S- und G2-Phase beschränkt, da nur dort der homologe Bereich auf dem Schwesterchromatid zur Verfügung steht. Die HR ist für die Reparatur spontan während der Replikation auftretender DSBs wichtig (Moynahan und Jasin 2010), da manche in der S-Phase auftretenden DSBs ausschließlich über HR repariert werden können (z.B. *one-ended DSBs* ohne zweites Bruchende s.u.) (Eppink et al. 2006, Lindahl 1993, Saleh-Gohari et al. 2005). Ist die HR durch Mutationen in beteiligten Faktoren beeinträchtigt, führt dies zu einer erhöhten Mutationsrate und Prädisposition für Krebserkrankungen. Fällt die HR komplett aus ist dies schon im embryonalen Stadium letal, da sich zu schnell Schäden während der Replikation akkumulieren. Es wird vermutet, dass die HR für die Reparatur von ca. 15% der DSBs in G2 essentiell ist. Neue Ergebnisse belegen die Bedeutung der HR für DSBs, die im Heterochromatin induziert wurden (Beucher et al. 2009, Goodarzi et al. 2008).

Nach der Detektion des DSBs durch den MRN-Komplex wird CtIP (*CtBP-interacting protein*) gebunden, und eine initiale Resektion findet statt, um einen kurzen 3'-Überhang zu erzeugen. Der kurze 3'-Überhang ist das Substrat für zwei redundante Mechanismen zur Resektion eines deutlich längeren Abschnitts. EXO1 als Exonuklease, oder ein Komplex aus BLM, TOPBII α , RMI1 und DNA2 entfernen über einen längeren Bereich das 5'-Ende (Mimitou und Symington 2009, Sartori et al. 2007). Die durch RPA (*replication protein A*) stabilisierte einzelsträngige DNA ist der erste Bindungspartner für RAD51. Katalysiert durch BRCA2, bildet RAD51 regelmäßige Ketten, die sich rechtshändig gewunden um einzelsträngige DNA herum anlagern, das sog. Nucleoprotein-Filament entsteht. Weiteren Proteinen (XRCC2, XRCC3) wird dabei eine unterstützende oder stabilisierende Wirkung zugesprochen. Über eine zweite Bindedomäne, die spezifisch für doppelsträngige DNA ist, vermittelt RAD51 im Anschluss die Invasion des Bruchendes in den homologen, doppelsträngigen Bereich des Schwesterchromatids (West 2003). Der verdrängte Einzelstrang bildet eine Schleife aus, den sog. *displacement loop* (D-Loop). RAD54 ist in der Lage, RAD51 von der DNA zu verdrängen (Mazin et al. 2010). Ob dies während der Strang-Invasion oder zum entgeltigen Entfernen von RAD51 wichtig ist, ist noch unklar. Der Strangaustausch mit dem homologen Abschnitt im Schwesterchromatid ist zentral für den Mechanismus der HR, da nun der geschädigte Strang durch Polymerase- δ und - η verlängert werden kann und damit der geschädigte Bereich wieder hergestellt wird. Mit der DNA-Synthese geht eine sukzessive Aufweitung des homologen dsDNA-Bereichs einher (*branch migration*). Der Bereich, an dem sich die homologen Einzelstränge überkreuzen, nennt man *holliday-junction* (HJ) (Holliday 1964).

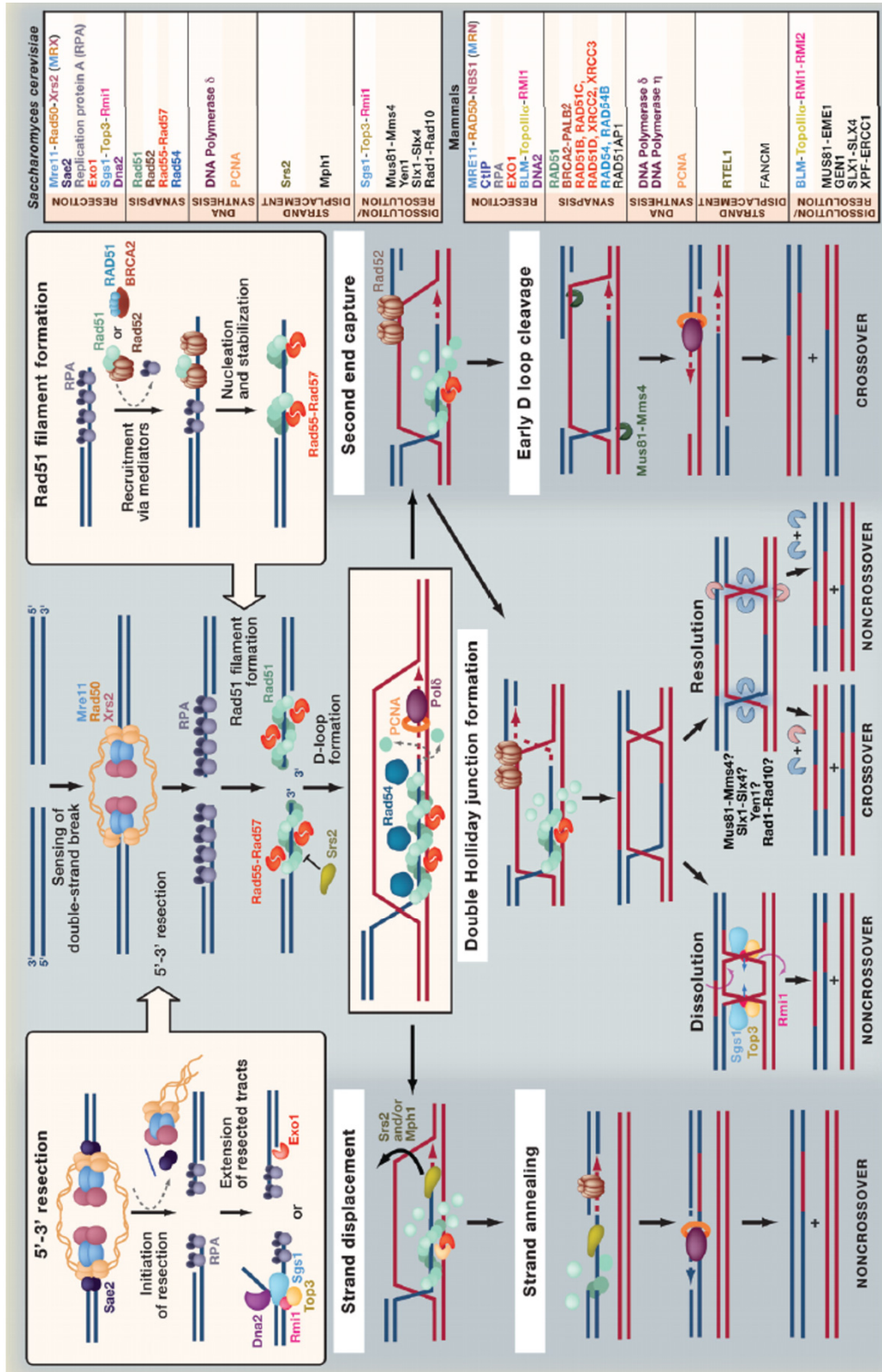


Abb. 7: Schematischer Ablauf der HR. Oben mitte: Die 5'-DNA-Enden werden resektiert und die Überhänge mit RPA stabilisiert. Mitte mitte: Mit Hilfe von RAD51, BRCA2, RAD54, u. a. wird der 3'-Überhang in den homologen DNA-Strang eingefädelt und die Polymerasen δ und η verlängern ihn bis über den geschädigten Bereich hinaus. Mitte unten: Passiert der gleiche Vorgang mit dem komplementären, geschädigten Strang so entsteht eine doppelte holliday-junction, die nach erfolgter Ligation der verlängerten 3'-Enden wieder aufgelöst werden muss. Weitere, einfachere Abläufe sind ebenfalls abgebildet und im Text erläutert. Abbildung aus (Mazon et al. 2010).

Nach diesen basalen Prozessen der HR gibt es mehrere Möglichkeiten zur Ausbildung von HJs, und mehrere Wege zu deren Auflösung in einem frühen oder späteren Stadium. Die einfachste Möglichkeit zum Abschluss der HR wird *synthesis dependent strand annealing* (SDSA) genannt. In einem Prozess, an dem RTEL1 und FANCM beteiligt sind, löst sich das verlängerte 3'-Ende vom homologen Strang (*strand displacement*) und lagert sich an das zugehörige, ebenfalls 5'-3'-resektierte zweite Bruchende an (*strand*

annealing). Nach dem Auffüllen verbliebener einzelsträngiger Bereiche und dem Abschneiden evtl. vorhandener Überhänge sind 2 identische Doppelstränge hergestellt (Le Breton et al. 2008, San Filippo et al. 2008). Wird die Strang-Invasion nicht bereits so früh beendet, finden die weiteren Prozesse unter Einbeziehung des zweiten Bruchendes statt (*second end capture*). Das freie 3'-Ende des zweiten Bruchendes lagert sich an den verdrängten Einzelstrang des D-Loops an, und am 3'-Ende findet DNA-Synthese statt. Diese Struktur kann früh unter Beteiligung von MUS81-EME1 geschnitten werden (*early D loop cleavage*), was immer zu einem *crossover* zwischen den beteiligten Chromatiden führt. Wird die DNA-Synthese nach dem *second end capture* fortgeführt und alle einzelsträngigen Bereiche aufgefüllt, entsteht eine Struktur aus zwei DNA-Doppelhelizes, die über eine *double-holliday-junction* (dHJ) verbunden sind. Zur Auflösung einer dHJ führen zwei Wege. Bei der *dHJ-resolution* werden die überkreuzten DNA-Einzelstränge durch Resolvasen geschnitten. Bekannt sind zurzeit 4 Resolvasen, MUS81-EME1, DEN1, SLX1-SLX4 und XPF-ERCC1 (Svendsen und Harper 2010). Die Bedeutung der Resolvasen variiert in unterschiedlichen Organismen, und innerhalb eines Organismus ist auch zwischen mitotisch und meiotisch teilenden Zellen zu unterscheiden. Generell können HJ auf zwei Arten geschnitten werden (Abb. 7 mitte unten). Werden beide HJ in der gleichen Orientierung geschnitten, findet kein *crossover* statt. Unterscheidet sich die Orientierung der Auflösung der beiden HJs, werden die Chromatidenden vertauscht und ein *crossover* findet statt. Bei der *dHJ-dissolution* werden die beiden HJs unter der Beteiligung von BLM durch eine Art rückwärtige *branch migration* aufeinander zugeführt und vereint. Es verbleibt ein *hemicatenane*, die Verbindung zweier Chromatiden über die Durchführung eines ssDNA-Stranges durch den Doppelstrang des Schwesterchromatides. Das *hemicatenane* wird aufgelöst, indem die zwei DNA-Einzelstränge durcheinander durch geführt werden. Diese Reaktion wird von TOPOIII α und RMI1-RMI2 katalysiert (Cheok et al. 2005, Hickson 2003).

2.5 Lebendzellmikroskopie

Die Lichtmikroskopie hat in den letzten Jahrzehnten viele Neuerungen erfahren. Durch Einsatz besserer Materialien wurden optische Systeme optimiert, um für sphärische oder chromatische Aberrationen zu korrigieren. Das Gebiet der konfokalen Mikroskopie, in der mithilfe einer Lochblende Signale ausserhalb der Fokusebene minimiert werden, hat eine große Bedeutung erlangt, und es gibt inzwischen eine ganze Reihe von Anwendungen, die auf der Konfokal-Technologie aufbauen (Wessels et al. 2010). Der Multiphotonlaser und das „Light-sheet-Mikroskop“ verbessern die Mikroskopierbarkeit tiefer Gewebsschichten (Denk et al. 1990, Huiskens et al. 2004). Die durch Abbè formulierte Auflösungsgrenze für Lichtmikroskope konnte durch neue optische Setups (4Pi) oder Beleuchtung (STED) durchbrochen werden (Hell 1992, Klar et al. 2000). Die Verfügbarkeit großer Rechenleistung machte die Dekonvolution, d.h. die

Restauration des mikroskopischen Bildes mithilfe des Computers, zu einer Standard-Methode (Ronneberger et al. 2008, Wallace W. 1998).

Die Mikroskopie findet in der DNA-Reparatur-Forschung breite Anwendung (Bekker-Jensen et al. 2006). Die Entdeckung der schadensabhängigen Phosphorylierung von H2AX am Serin139 versetzte in die Lage, einzelne DSBs im Mikroskop nachzuweisen und somit viel niedrigere Schadensdosen untersuchen zu können (Rogakou et al. 1999, Rothkamm und Lobrich 2003). Ältere Methoden der DNA-Schadens-Quantifizierung wie die Pulsfeldgelelektrophorese ermöglichen die Beobachtung der Reparatur nach >10 Gy, mit der γ H2AX-Methode lassen sich Schäden nach <10 mGy messen. Damit stößt man in Dosisbereiche vor, die für radiologische Fragen oder den Strahlenschutz relevant sind. Die Mikroskopie eröffnete Einsicht in das Zusammenspiel verschiedenster Reparatur- und Zellzyklusfaktoren. Gerade die Lebendzellmikroskopie bietet die Chance, durch die Visualisierung zeitlicher Abläufe das Verständnis der für die DNA-Reparatur wichtigen Netzwerke in Reparatur- und Zellzykluskontrolle weiter zu vertiefen (Essers et al. 2005, Leonhardt et al. 2000, Soutoglou und Misteli 2008).

Die Aufnahme von lebenden Objekten in der Lebendzellmikroskopie kann in die 50er Jahren des vorigen Jahrhunderts zurückverfolgt werden. Mit dem Film eines Neutrophilen in einer Blutprobe im 16mm-Format nahm diese Technik ihren Anfang (Rogers 1955). Durch die Nutzung fluoreszenter Proteine, die mit nahezu jedem Zielprotein fusioniert werden können, wurde die Lebendzellmikroskopie revolutioniert (Hoffman 2005). Seit der Entdeckung des *green fluorescent protein* (GFP) durch Shimomura 1996 wurden weitere fluoreszente Proteine gefunden oder entwickelt, sodass inzwischen für die meisten Wellenlängenbereiche ein Protein vorhanden ist (Goldman und Spector 2005, Shimomura 2009). Die Aufnahmen fluoreszenter Proteine, seien sie mit Weitfeld-, mit konfokalen Mikroskopen oder sogar Multi-Photon-Mikroskopen erstellt, erweitern heute das Methodenspektrum in der Lebendzellmikroskopie. Viele Lebendzellmikroskopie-Systeme werden derzeit betrieben, um schnelle Prozesse wie die Bewegung von Motorproteinen oder die Austausch-Raten gebundener Proteine (FRAP) beobachten zu können. Technisch anspruchsvolle Komponenten wie erschütterungsfrei arbeitende *shutter*, monochromatische Beleuchtungen und sehr schnelle Computer-Festplattensysteme kommen zum Einsatz, um die Bildaufnahme zu beschleunigen und höhere Frame-Raten zu erreichen. In den letzten 10 Jahren konnte mit Lebendzellmikroskopie Licht in unterschiedliche Gebiete der DNA-Reparatur und Zellzykluskontrolle gebracht werden. So wurden z.B. die Rekrutierungsgeschwindigkeit und -Reihenfolge von Reparaturfaktoren zum DSB beschrieben (Dinant et al. 2009), die Abläufe der Replikation wurden visualisiert (Leonhardt et al. 2000) und die Mechanismen der Checkpoint-Induktion untersucht (Lukas et al. 2003). Zu den Schwierigkeiten der Mikroskopie kommt in der Lebendzellmikroskopie die Herausforderung der Inkubation. Die lebenden Zellen unter dem Mikroskop dürfen durch die Beobachtung nicht soweit gestresst sein, dass der beobachtete Prozess beeinflusst ist. Gerade bei der Benutzung konfokaler Mikroskope können die hohen Frame-Raten und intensiven Belichtungen innerhalb

kurzer Zeit zur Schädigung der Zellen führen (Bernas et al. 2004, Foyer et al. 1994). Untersucht man Effekte, die sich innerhalb weniger Sekunden abspielen, ist diese Schädigung zu vernachlässigen. Beobachtet man die Zellen jedoch über Stunden und Tage, werden sie immer wichtiger. Neben der Menge des zur Anregung verwendeten Lichtes sind die photochemischen Eigenschaften des Fluorophores entscheidend für das Ausmaß des Schadens (Sugden 2004). Über angeregte Fluorophore entstehen ROS, was die Schädigung einer Vielzahl von Zellstrukturen zur Folge hat. Proteine, Nukleinsäuren, Lipide und Fluorophore werden oxidiert und als Folge tritt Ausbleichen, Zellzyklus-Störungen/-Arrest und sogar Zelltod ein (Dixit und Cyr 2003, Hsi et al. 1999, Martin et al. 2005, Vrouwenraets et al. 2003). Neben direkter Schädigung durch ROS gibt es auch im Bereich physiologischer ROS-Konzentrationen Mechanismen, die das Zellzyklusverhalten beeinflussen können, da sie auf den APC wirken (Havens et al. 2006). Setzt man die Lebendzellmikroskopie zum Studium der DNA-Reparatur und der Zellzyklusregulation ein, motiviert dieses Wissen, sorgfältig die ungestörte DNA-Reparatur und das Zellzyklusverhalten zu kontrollieren.

2.6 Motivation und Zielsetzung

Die Reaktion von Zellen auf die Induktion von DSBs ist fein abgestimmt. Es existieren Regulationsmechanismen, welche die Zellzykluskontrolle, die Reparaturmechanismen und die Apoptose koordinieren, und welche, im Zusammenspiel, die genomische Integrität der Zelle sicherstellen. Ein wichtiges Merkmal entarteter Zellen ist der Verlust oder die Veränderung dieser Regulationsmechanismen, was eine deregulierte Proliferation und die Ansammlung von Mutationen zur Folge hat. Die große Anzahl genetischer Veränderungen ermöglicht Krebszellen die Anpassung an unterschiedlichste Wachstumsbedingungen. Somit ist das Verständnis der Mechanismen, die zum Verlust der genomischen Integrität bzw. zur Progression der Zellen beitragen, wichtig zur Einschätzung des Risikos durch DNA-Schädigung und für die Therapie von Krebserkrankungen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Zusammenspiel von Zellzykluskontrolle und Reparatur nach Röntgen-Bestrahlung speziell am G2/M-Übergang untersucht werden. Zu Beginn dieser Arbeit wurde in anderen Projekten unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass Zellen mit bis zu 20 DSBs den G2/M-Checkpoint aufheben (Deckbar et al. 2007). Mit Hilfe der Lebendzellmikroskopie sollte dieses Verhalten am G2/M-Checkpoint auf Einzelzellebene genauer charakterisiert werden. Der erste Teil der Arbeit sollte sich mit der Etablierung der Lebendzellmikroskopie beschäftigen, d. h. mit dem Finden und Testen der richtigen Inkubatoren, Objektive etc., Optimierung der Kultivierungsbedingungen unterm Mikroskop, und Entwicklung des generellen Ablaufs eines Lebendzellmikroskopie-Versuchs. Nach der Etablierung der Technik sollte die Reparatur in G2 und das G2/M-Checkpoint-Verhalten nach Bestrahlung anhand einzelner, lebender Zellen untersucht werden. Da sich Zellen mit DSBs teilen sollte auch das weitere Schicksal dieser Zellen in den folgenden Zellzyklus-Phasen (M und G1) untersucht werden. Neben der

Lebendzellmikroskopie sollten auch klassische Methoden wie die Immunfluoreszenz-Mikroskopie (IFM) und die Durchflusszytometrie (FACS) zum Einsatz kommen.

3 Material und Methoden

3.1 Material und Chemikalien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Deckgläser, 15x15mm	Roth
Latexhandschuhe Ansell Derma Clean	VWR
Nitrilhandschuhe Neoprotect	Neolab
Objektträger superfrost	Roth
Parafilm	Roth
Pasteurpipetten, Glas	Roth
Pasteurpipetten, Kunststoff	Roth
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reaktionsgefäße SafeSeal 1,5ml; 2ml	Roth
Rundbodenröhrchen für FACS	BD Bioscience
Wischtücher KimWipes	Neolab
Zellkulturflaschen 25 cm ²	Biochrom
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Biochrom
Zellkulturschalen Nunclon 35x10 mm	VWR
Zellkulturschalen Nunclon 60x15 mm	VWR
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Neolab

Tabelle 3: Geräte

Durchflusszytometer	Cytomics FC500	Beckman&Coulter
Inkubatoren	Hera cell 240	ThermoScientific
Inversmikroskop (Zellkultur)	Eclipse TS100	Nikon
Kühl- und Gefrierschränke		Liebherr
Kühltruhe -70°C	Herafreeze	Thermo scientific
Magnetrührer	Varimag®	H+P Labortechnik
Mikroliterpipetten		Gilson
pH-Meter	pMX2000	WTW
Pipettierhilfe	Pipetboy	Integra
Röntgenröhre	Isovolt TitanE	GE München
Sterilwerkbänke	Herasafe	Thermo scientific
Stickstofftank	Locator 8+	Thermolyne
Tischzentrifuge		neolab
Transfektionssystem		Amaya
Vortex	genie2	Scientific industries
Waagen	TE1502S	Satorius
	TE153S-DS	Satorius
Wasserbad		Memmert
Zählkammer	Neubauer Zählkammer	Marienfeld
Zentrifugen	Centrifuge 5804R	Eppendorf
	Centrifuge 5810R	Eppendorf
	Centrifuge 5415R	Eppendorf

Tabelle 4: Mikroskop-Filterwürfel

Anregung	Strahlenteiler	Sperrfilter	Farbstoffe	
D350/50	400DCLP	ET 460/50	DAPI	AHF Tübingen
ET470/40	T495LP	ET525/50	EGFP/FITC/Alexa488	AHF Tübingen
ET560/40	T585LP	ET630/75	RFP/Texas Red/Alexa594	AHF Tübingen
ET500/20	ET515LP	ET535/30	YFP	AHF Tübingen

Tabelle 5: Chemikalien

4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich
Aphidicolin	Calbiochem
ATM Kinase Inhibitor (# 118500)	Calbiochem
Bovines Serumalbumin (BSA)	Applichem
Bromdesoxyuridin (BrdU)	BD Pharmingen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
<i>Fetal Calf Serum (FCS)</i>	Biochrom AG
Formaldehyd	Roth
G418	Roth
Glycerin	Roth
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth
Kalziumchlorid (CaCl_2)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
<i>Non Essential Aminoacids (NEAA)</i>	Biochrom AG
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG
Propidiumiodid (PI)	Roth
Puromycin	Roth
Silikonöl AR 200	Fluka
TritonX-100	Roth
Tween20	Roth
<i>Primäre Antikörper</i>	
Mouse Anti-53BP1 (#05-726)	Millipore
Rabbit Anti-BLM (ab2179)	Abcam
Mouse Anti-GFP (#11814460001)	Roche
Rabbit Anti-MDC1 (ab11169)	Abcam
Mouse Anti-phospho-H2AX (Ser139) (#05-636)	Millipore
Rabbit Anti-phospho-H2AX (Ser139) (ac11174-50)	Abcam
Rabbit Anti-phospho-Histone3 (Ser10) (#06-570)	Millipore
Mouse Anti-phospho-Histone3 (Ser10) (#9706)	Cell Signaling Technology
Rabbit Anti-RAD51 (PC130)	Calbiochem
<i>Sekundäre Antikörper</i>	
Goat Anti-Mouse IgG-AlexaFluor488	MolecularProbes
Goat Anti-Mouse IgG-AlexaFluor594	MolecularProbes
Goat Anti-Rabbit IgG-AlexaFluor488	MolecularProbes
Goat Anti-Rabbit IgG-AlexaFluor594	MolecularProbes

Tabelle 6: Lösungen, Puffer, Medien

1x PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
Blockierlösung in der Immunfluoreszenz	0,1% (v/v) Tween 20; 3% (w/v) BSA in PBS
DAPI-Färbelösung	0,4 µg DAPI/ml PBS
Einfriermedium	20%(v/v) Zellkulturmedium; 20%(v/v) DMSO; 60%(v/v) FCS
Fixierlösung in der Immunfluoreszenz	3,7% Formaldehyd in PBS
Permeabilisierungslösung in der Durchflusszytometrie	0,25% TritonX-100 in PBS
Permeabilisierungslösung in der Immunfluoreszenz	0,2% TritonX-100 in PBS
PI-Lösung	0,05 mg/ml Propidiumiodid; 0,5 mg/ml RNase A in PBS
Trypsin/ EDTA	0,5 M EDTA; 2,5% (v/v) Trypsin in PBS; pH 8
Zellkulturmedium	Biochrom, Details in der Beschreibung der Zelllinien

3.1.1 Zelllinien

U-2 OS U-2 OS-Zellen sind Osteosarkom-Zellen, die aus der Biopsie des Schienbeins eines 15-jährigen Mädchens aus dem Jahre 1964 stammen. Bezogen wurde die Zelllinie über die *American Type Culture Collection* (ATCC) (Heldin et al. 1986). Die Kultivierung erfolgte in *Dulbecco's minimal essential medium* (DMEM) mit 10% FCS und 1% NEAA.

U2-OS GFP-53BP1 U2-OS GFP-53BP1-Zellen sind stabil mit einem EGFP-53BP1 exprimierenden Plasmid transfiziert. Die aus der Maus stammende Sequenz für 53BP1 wurde dazu in einen pEGFP-C1 Vektor (Clontech) kloniert. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Claudia Lukas (Danish Cancer Society, Institute of Cancer Biology, Copenhagen, Denmark) zur Verfügung gestellt (Bekker-Jensen et al. 2005). Die Kultivierung erfolgte in DMEM mit 10% FCS, 1% NEAA und 1 µg/ml Puromycin.

U2-OS GFP-MDC1 U2-OS GFP-MDC1 Zellen sind stabil mit einem EGFP-MDC1 exprimierenden Plasmid transfiziert. Die humane Sequenz für 53BP1 wurde dazu in einen pEGFP-C2 Vektor (Clontech) kloniert. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Claudia Lukas (Danish Cancer Society, Institute of Cancer Biology, Copenhagen, Denmark) zur Verfügung gestellt (Lukas et al. 2004). Die Kultivierung erfolgte in DMEM mit 10% FCS, 1% NEAA und 400 µg/ml G418.

82-6 hTert 82-6 hTert sind humane Hautfibroblasten, die durch die Transformation eines

hTert-exprimierenden (*human Telomerase reverse transcriptase*) Retrovirus immortalisiert wurden. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. P. A. Jeggo (University of Sussex, Brighton, UK) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in Minimal Essential medium (MEM) mit 20% FCS und 1% NEAA

HT 1080 YFP-53BP1 HT 1080 YFP-53BP1 sind humane Fibrosarkom-Zellen, die 1972 in Kultur genommen wurden (Chen et al. 1983). Ein YFP-53BP1-Konstrukt wurde in einen modifizierten pCNA3 Vektor kloniert und die HT 1080 Zellen wurden mit diesem Konstrukt stabil transfiziert (Asaithamby und Chen 2009). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. D. J. Chen (Department of Radiation Oncology, University of Texas, USA) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in DMEM mit 15% FCS, 1% NEAA, 1% P/S und 400 µg/ml G418.

3.2 Zellkultur

Bei allen verwendeten Zellen handelt es sich um adhärent wachsende Linien. Die Kultur fand meist in Polyethylen-Zellkulturflaschen statt, die einen gasdurchlässigen Deckel besitzen. Die Zellen wurden im Kulturschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Durch die erhöhte CO₂-Konzentration wurde der pH-Wert des über NaHCO₃ gepufferten Mediums konstant gehalten. Während eines Versuchs wurden die Zellen meist in anderen Gefäßen kultiviert.

Die Tumorzelllinie U-2 OS ist relativ stabil und kann lange kultiviert werden. Bei ca. Passage 70 wurde eine neue Kultur gestartet. Die primäre Zelllinie 82-6 hTert verlangsamt das Wachstum deutlich früher, bei ca. Passage 25. Bei den stabil transfizierten U-2 OS Zelllinien lässt die Expression des GFP-Konstrukts mit steigender Passagenzahl nach weshalb sie 18-20 mal passagiert wurde.

3.2.1 Passagieren von Zelllinien

Das Passagieren der Zelllinien erfolgte bei einer optischen Konfluenz von 90-100%, um ein stets exponentielles Wachstum zu ermöglichen. Um die Zellen vom Kulturgefäß zu lösen, wurde das Medium abgesaugt, restliches Medium mit PBS abgespült und die Zellen für 5 min unter einem Film von Trypsin/EDTA inkubiert. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von Kulturmedium gestoppt. Nach Vereinzelung der Zellen durch wiederholtes Pipettieren wurde mit 1/3 bis 1/12 der Zellsuspension eine neue Flasche mit vorgewärmten Medium angeimpft. Die passagierten Zellen waren nach 4-5 Tagen erneut zu 90% konfluent.

3.2.2 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturgefäße abgelöst, in Medium aufgenommen und die Zelldichte über das Zählen der Zellen in dem definierten Volumen einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Das Volumen wurde im Anschluss so eingestellt, dass die pro Aliquot vorgesehene Zellzahl in 0,9 ml vorlag. Auf Eis wurde im Verhältnis 1:1 kaltes Einfriermedium zur Zellsuspension gegeben und je 1,8 ml in Kryoröhrchen pipettiert. In einem isolierenden Styroporgefäß wurden die Zellen zunächst bei -80°C gekühlt und nach 1-2 Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.3 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen wurde das Aliquot dem Stickstofftank entnommen und ca. 2 min im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Da die Zellen in DMSO eingefroren sind, nehmen sie im aufgetauten Zustand schnell Schaden. Die Zellsuspension wurde in ca. 10 ml PBS überführt und mit 300 g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium aufgenommen und in eine Flasche überführt. Nach 10-24 h wurde das Medium gewechselt, um evtl. verbliebene Reste von DMSO zu beseitigen. Nach 2-4 Tagen konnten die Zellen zum ersten Mal passagiert werden.

3.2.4 Aussaat

Die Aussaat in μ Slides wird im Abschnitt Lebendzellmikroskopie beschrieben. Für die Aussaat auf Deckgläschen wurden fünf sterile Deckgläschen in kleinen Petrischalen (8,8 cm²) ausgelegt. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA abgelöst, in Medium aufgenommen und die Zelldichte bestimmt. Nach dem Überschichten der Deckgläschen mit frischem Medium wurde das benötigte Volumen Zellsuspension zugegeben und durch leichtes Schwenken gleichmäßig verteilt.

3.2.5 Aphidicolin-Behandlung

Aphidicolin wurde in einer Konzentration von 3 μ g/ml Medium eingesetzt. Es inhibiert die an der DNA-Replikation beteiligten DNA-Polymerasen α , δ und ϵ (Takisawa et al. 2000, Wright et al. 1994). Wichtig in diesem Zusammenhang ist, dass die für die HR bedeutende DNA-Polymerase ν nicht inhibiert wird (Moldovan et al. 2010, Takata et al. 2006), die Reparatur in G2-Phase-Zellen ist also nicht beeinflusst.

Benutzt wurde Aphidicolin aus zweierlei Gründen. Nach Zugabe wird die Replikation gestoppt und die Zellen können nicht aus der S- in die G2-Phase gelangen. Bei Erstellung einer G2-Reparaturkinetik kann man so die Kontamination der G2-Phase durch in der S-Phase bestrahlte Zellen verhindern. Nach Inhibition der Replikations-Polymerasen entstehen viele einzelsträngige Bereiche im Genom. Dadurch wird in der S-Phase H2AX phosphoryliert, und die Zelle ist an ihrem flächigen γ H2AX-Signal als S-Phase-Zelle erkennbar.

3.3 Bestrahlung

Die Bestrahlungen der Zellen wurden in einer Isovolt TitanE (GE München) Röntgenröhre mit Wolfram-Anode bei einer Spannung von 90 kV und einer Stromstärke von 19 mA durchgeführt. In der verwendeten Bestrahlungshöhe von 30 cm über dem Austrittsfenster wurde nach Filterung durch 1 mm Aluminium eine Dosisleistung von 3 Gy/min erreicht. Diese wurde durch Fricke-Dosimetrie sowie durch Messung mit einem PTW-Weichstrahlkammer-Dosimeter bestimmt und in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Bei der Bestrahlung von auf Glasdeckgläschen wachsenden Zellen musste ein zusätzlicher Gewichtungsfaktor berücksichtigt werden, der sich durch einen Grenzeffekt an der Glasoberfläche ergibt. Im Glas entstehen bei Bestrahlung durch die höhere Ordnungszahl der vorkommenden Atome mehr Sekundärelektronen als in Plastik oder der biologischen Probe. Diese Elektronen treten aus dem Glas aus und schädigen direkt auf der Oberfläche sitzende Zellen, werden jedoch aufgrund ihrer geringen Reichweite nicht durch Fricke-Dosimetrie oder ein Dosimeter exakt detektiert. Die effektiv verabreichte Dosis ist bei Bestrahlung auf Glasdeckgläschen um etwa den Faktor 2 höher als bei Bestrahlung auf Kunststoffoberflächen wie z.B. Zellkulturflaschen (Kegel et al. 2007). Dieser Umstand wurde bei allen Dosisangaben in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt.

3.4 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

3.4.1 Fixierung

Nach der Behandlung und evtl. Reparaturzeit wurden die Zellen zur Fixierung 15 min bei RT mit 3,7% Formaldehyd/PBS inkubiert. Nach dreifacher Inkubation für 10 min in PBS wurden die Zellen zur Permeabilisierung der Zellmembran für 5 min bei 4°C mit 0,2% TritonX-100/PBS behandelt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS/1%FCS wurden die Zellen mindestens 30 min bei RT mit PBS/3%BSA/0,1%Tween20 blockiert. Dieser Schritt konnte bei Bedarf bei 4°C über Nacht fortgesetzt werden.

3.4.2 Antikörper-Färbung

Die Antikörper wurden in Blockierlösung angesetzt. Deckgläschen oder Ibidi- μ Slides wurden in Feuchten Kammern ausgebracht und mit der Antikörper-Lösung überschichtet. Bei sekundären Antikörpern wurde auf Dunkelheit geachtet. Die typischerweise benutzten Bedingungen sind der unten stehenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 7: Antikörper

<i>Primäre Antikörper</i>	<i>Bedingungen</i>
Mouse Anti-53BP1 (#05-726)	1:200, 1h, RT
Rabbit Anti-BLM (ab2179)	1:200, 1h, RT
Rabbit Anti-CENP-F (C19)	1:200, 1h, RT
Mouse Anti-GFP (#11814460001)	1:250, 1h, RT
Rabbit Anti-MDC1 (ab11169)	1:250, 1h, RT
Mouse Anti-phospho-H2AX (Ser139) (#05-636)	1:500, 1h, RT; 1:2000, über Nacht, 4°C
Rabbit Anti-phospho-H2AX (Ser139) (ac11174-50)	1:1000, 1h, RT
Rabbit Anti-phospho-Histone3 (Ser10) (#06-570)	1:200, 1h, RT
Mouse Anti-phospho-Histone3 (Ser10) (#9706)	1:500, 1h, RT
Rabbit Anti-RAD51 (PC130)	1:10.000, über Nacht, 4°C
<i>Sekundäre Antikörper</i>	
Goat Anti-Mouse IgG-AlexaFluor488	1:500, 1h, RT
Goat Anti-Mouse IgG-AlexaFluor594	1:1000, 1h, RT
Goat Anti-Rabbit IgG-AlexaFluor488	1:500, 1h, RT
Goat Anti-Rabbit IgG-AlexaFluor594	1:1000, 1h, RT

Nach der Inkubation mit der Antikörperlösung wurde einmal mit PBS/1%FCS gespült und 2x für 10 min mit PBS/1%FCS inkubiert.

Meistens erfolgte nach der Antikörper-Färbung eine Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI-Färbelösung. Nach der DAPI-Lösung wurde einmal mit PBS gespült und 1x mit PBS 10min. inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen mit einem Tropfen Mounting Medium auf den Objektträger aufgebracht und mit Nagellack versiegelt.

3.4.3 Mikroskopmodelle

Es wurden verschiedene Mikroskop-Modelle der Marke Zeiss benutzt. Für die Auswertung der Ibbidi-µSlides konnten ausschließlich die inversen Stative Axio Observer D1 und Axiovert 200M verwendet werden. Für die Mikroskopie der Deckgläschen wurden auch die aufrechten Stative, AxioPlan 2 und Axioskop 2 eingesetzt. Die meisten Stative sind voll motorisiert und über einen PC gesteuert.

3.4.4 Automatische Bestimmung der Zellzyklus-Phase

Zur exklusiven Auswertung von G1- oder G2-Phase-Zellen wurde ein automatisierbares Verfahren angewendet. Anhand der Software MetaCyte (Metasystems, Altlußheim) können fixierte Zellen aufgenommen, erkannt und Färbeintensitäten innerhalb der Zellkerne gemessen werden. Die Intensität der DAPI-Färbung korreliert mit dem DNA-Gehalt der Zellkerne, wodurch G1- und G2-Phase sauber diskriminiert werden können. Problematisch bei diesem Verfahren sind die S-Phase-Zellen, welche einen

variablen, zwischen dem einer G1- und einer G2-Zelle liegenden DNA-Gehalt aufweisen. Nach Aphidicolinzugabe entwickeln S-Phase-Zellen ein flächiges γ H2AX-Signal, über welches sie aus der Analyse ausgeschlossen werden konnten (siehe Abb. 8 und 3.2.5).

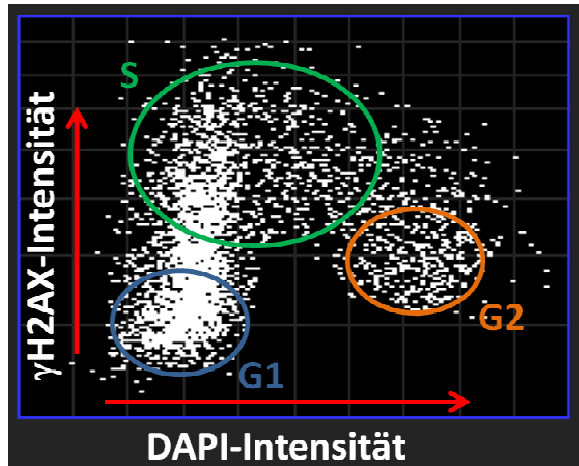


Abb. 8: Zellzyklusverteilung dargestellt in der MetaCyte-Software. Jede identifizierte Zelle ist durch einen Punkt repräsentiert. Vertikal ist die Intensität der γ H2AX-Färbung, horizontal die Intensität der DAPI-Färbung aufgetragen. In diesem Dot-Plot kann eine Region markiert werden, z.B. G2-Phase-Zellen. Diese Zellen können im Anschluss gezielt angefahren werden, um sie aufzunehmen oder auszuwerten. Der Screenshot wurde freundlicherweise von Dr. Olivia Barton zur Verfügung gestellt.

3.4.5 Bildaufnahme

Zur Dokumentation oder der späteren Auswertung am Bildschirm wurden Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen erstellt. Dazu waren die meisten Mikroskope mit einer ungekühlten *charged coupled device* (CCD)-Kamera der Firmen Zeiss (AxioCam), Jai (Jai MV4 CL) oder MetaSystems (CoolCube 1) ausgerüstet. Für die Bildaufnahme wurden die Programme MetaCyte oder Isis der Firma MetaSystems oder AxioVision der Firma Zeiss verwendet. Wurden Foci aufgenommen, ist eine Erfassung aller im Nukleus befindlichen Signale wichtig, um diese korrekt quantifizieren zu können. Hierfür wurden Bilderstapel, sog. *z-stacks* aufgenommen. Da die verwendeten Objektive über eine unterschiedliche Schärfentiefe verfügen, wurde in der Aufnahme-Software ein jeweils adäquater Abstand zwischen den Z-Ebenen für die definiert. Besonders für eine Dekonvolution im Anschluss ist ein passender Z-Abstand wichtig. Die benutzten z-Abstände betrugen ca. 750 nm für das 40x Objektiv, ca. 250 nm für das 63x und ca. 350 nm für das 100x Objektiv. Die Bilder wurden im unkomprimierten TIFF-Format abgespeichert, bzw. weiter verarbeitet.

3.4.6 Bildverarbeitung

Einfache Darstellungen von Zeitreihen, Größenstandards und Projektionen von Stapelaufnahmen wurden mit ImageJ durchgeführt (Rasband und <http://rsb.info.nih.gov/ij>).

Zur Dokumentation wurden einzelne Bilder dekonvolviert. Dazu wurde die Software Huygens Professional 3.5.1p2 64bit der Firma Scientific Volume Imaging (SVI) eingesetzt.

3.5 Lebendzellmikroskopie

3.5.1 Zellkultur

Für die Lebendzellmikroskopie wurden μ Slides der Firma Ibidi verwendet (Abb. 9). Diese Kulturgefäße haben das Standard-Format eines Mikroskopie-Objektträgers und passen somit in die Aufnahme von Mikroskoptischen. Die in die μ Slides eingelassenen Kanäle gewährleisten eine homogene Aussaat der Zellen, die Begasung mit CO_2 zur Aufrechterhaltung des pH-Werts kann durch die Wände des Kanals erfolgen, der dünne Folienboden ermöglicht hochauflösende Mikroskopie mit geringen Arbeitsabständen, und die Verdunstung des Mediums kann durch Überschichtung der Mediumreservoirs mit Silikonöl verhindert werden. Ein großer Vorteil der Ibidi- μ Slides gegenüber offenen Gefäßen besteht auch in der

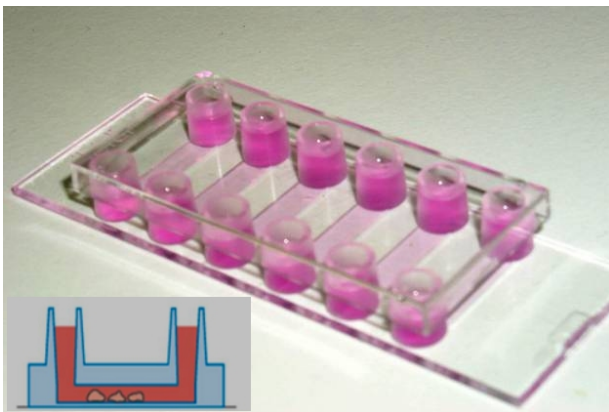


Abb. 9: μ Slide VI der Firma Ibidi. Die Zellen wachsen in einem mit Medium gefüllten Kanal. Der Kanal ist in das Plastik des μ Slides eingelassen und von unten mit einer Folie verschlossen. Durch die Folie findet die mikroskopische Beobachtung statt. Der Kanal endet an beiden Seiten in einem Reservoir mit Medium. Gegen Verdunstung wird das Medium mit einem Tropfen Silikon-Öl (Fluka) überschichtet.

Vermeidung einer konkaven Medium-Oberfläche. Die schräge Oberfläche stört die Mikroskopie.

Die Zellen wurden 48 h vor Versuchsbeginn in μ Slides ausgesät. Je nach Zelllinie wurden 8000-15000 Zellen pro Kanal ausgesät. Dazu wurde die benötigte Zellzahl in 30 μl Medium aufgenommen und direkt in den Kanal pipettiert. Die an beiden Enden des Kanals liegenden Mediumreservoirs wurden vorsichtig mit je 50 μl Medium befüllt und im Anschluss mit 15 μl Silikon-Öl überschichtet.

3.5.2 Bestrahlung der μ Slides

Ein Vorteil der μ Slides ist die gemeinsame Handhabung verschiedener Versuchsansätze. Schnell zeigte sich jedoch die extreme Empfindlichkeit der Zellkulturen auf Temperaturschwankungen, die vom lediglich 130 μl betragenden Volumen pro Kanal nicht gepuffert werden können. Daher wurde ein Behälter aus Styropor angefertigt, der mit Wasser gefüllte Reaktionsgefäße enthielt, um thermisch träge zu werden. Zentral ist eine Bleiplatte mit definiertem Abstand zur Unterkante des Behälterbodens eingeklebt (siehe Abb. 10). In die Bleiplatte sind Aussparungen verschiedener Größe gefräst, um eine Bestrahlungsmaske zu erhalten und einzelne Kanäle oder Gruppen von Kanälen der μ Slides bestrahlen zu können. Der zusätzliche Abstand zwischen Behälterboden und Position des μ Slides im Behälter wurde bei der Positionierung über

der Röntgenröhre berücksichtigt. Im Gegensatz zur Bestrahlung auf Deckgläschen musste bei in IbidiS wachsenden Zellen kein Effekt durch die Bestrahlung auf Glas berücksichtigt werden (Kegel et al. 2007). Die Bestrahlung erfolgte mit 90kV und 19 mA in einem Abstand von 30 cm zur Röhre. Die resultierende Dosisleistung betrug 3 Gy/min.

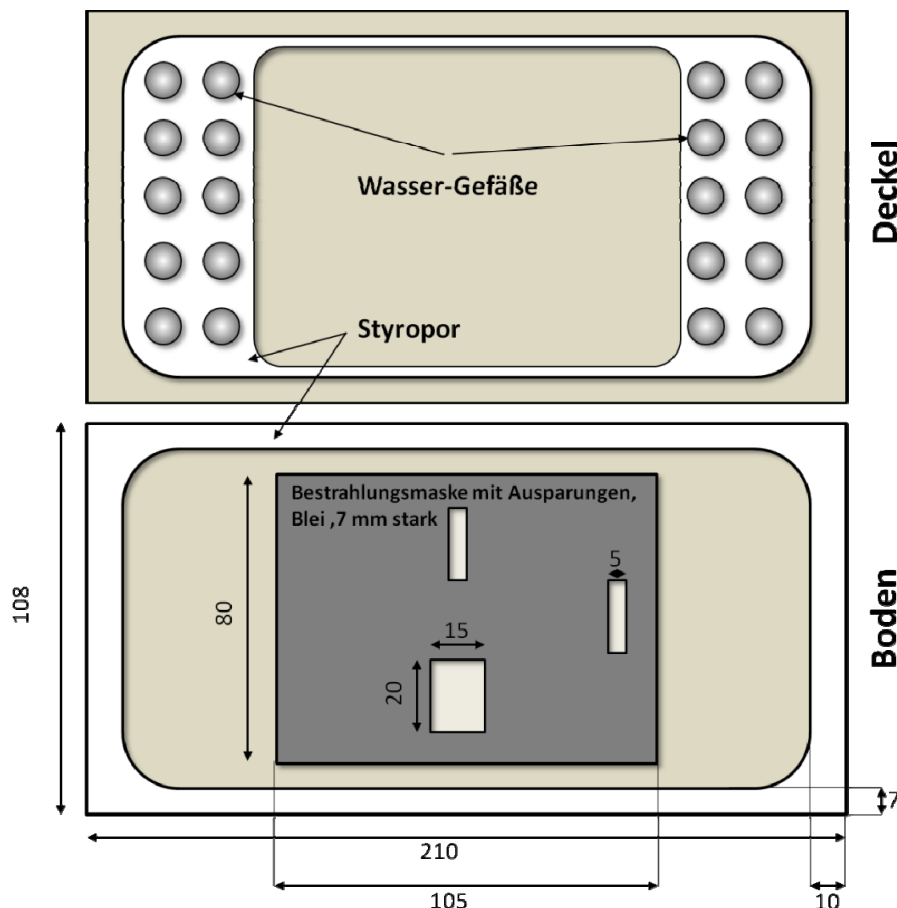


Abb. 10: Inkubator mit eingebauter Bestrahlungsmaske. Der Inkubator wurde im Eigenbau aus einer Styropor-Box für einzelne Reaktionsgefäße hergestellt. Im Deckel wurden wassergefüllte 2 ml-Reaktionsgefäße eingeklebt, um nach dem Anwärmen die Temperatur besser halten zu können. Die Maße sind in mm angegeben.

3.5.3 Lebendzellmikroskop

Für die Lebendzellmikroskopie wurde ein Axiovert 200M (Zeiss) verwendet. Dabei handelt es sich um ein inverses Weitfeld-Mikroskop. Es verfügt über einen Durchlicht- und einen Auflicht-Strahlengang, sowie einen motorisierten Kondensor, der auch Phasenkontrastblenden enthält. Das Auflicht stammt aus einer eingekoppelten HBO-Quecksilber-Kurzbogenlampe (Osram) und verfügt über einen Verschluss (Shutter), kann aber auch über einen geeigneten Einsatz im Filterwürfel-Karussell abgeblendet werden. Die HBO-Brenner nehmen in ihrer Helligkeit innerhalb von 50 Betriebsstunden stark ab. Daher wurden Neutralfilter verwendet um die Intensitätsunterschiede zwischen den Versuchen auszugleichen. Generell wurde mit 6-25% der Lampenintensität belichtet. Daraus resultierten typische Belichtungszeiten von 80-250 ms für die verwendeten GFP-Konstrukte. Als Durchlichtquelle dient die Standard-Halogenlampe HAL 100 (Zeiss). Das langsame An- und Ausschalten dieser Lampe wurde umgangen, indem ein zusätzliches Filterrad in den

Durchlicht-Strahlengang eingefügt wurde. Das Filterrad hat eine offene und eine geschlossene Position und fungiert somit als Shutter des Durchlichts. Durchlichtaufnahmen erfolgten ausschließlich im Phasenkontrast. Mit einer Spannung von 5 V an der Halogenlampe ergaben sich typische Belichtungszeiten zwischen 7-26 ms. Die Fokussierung erfolgte beim Axiovert 200M über die motorisierte Vertikalbewegung des Objektivrevolvers. Das motorisierte Filterwürfel-Karussell enthält Filtersets für die gängigen fluoreszenten Proteine (GFP, YFP und RFP) sowie für die Fluorochrome der Immunfluoreszenz (DAPI, FITC/Alexa499, Texas Red /Alexa594). Als Mikroskoptisch ist ein motorisierter Verschiebetisch (Märzhäuser) mit vier Objektträgeraufnahmen verbaut.

Für die Aufnahme lebender Zellen haben sich vor allem zwei Objektive als geeignet herausgestellt. Das 10x Plan Apochromat Phasenkontrast 1 (Zeiss) hat eine numerische Apertur von 0,45 und ermöglicht durch sein großes Bildfeld die Aufnahme vieler Zellen im Durchlicht. Mit diesem Objektiv wurden vor allem mitotische Indizes gemessen, deren Auswertung auf einer großen Anzahl von Zellen beruht. Zur Aufnahme von Foci in der Lebendzellmikroskopie wurde das 40x Plan Neofluar Phasenkontrast 2 (Zeiss) mit einer numerischen Apertur von 0,7 verwendet. Bei diesem Objektiv genügte sowohl Vergrößerung als auch Lichtstärke zum Erkennen der Foci, während bei entsprechend gewählten Aufnahmebedingungen die Zellen nur mit geringen Lichtstärken belastet wurden. In wenigen Fällen wurde das 63x Plan Apochromat Phasenkontrast 3 mit einer numerischen Apertur von 1,4 verwendet. Dieses Objektiv ist extrem lichtstark und somit auch belastender für die Zellen.

Um das Stativ samt Tisch wurde ein Inkubator XL (Pecon) montiert. Die Temperatur im Inkubator war über einen Sensor, eine Steuerungseinheit und einen Heizlüfter auf 37°C eingestellt. Innerhalb von 15-20 min heizte sich das gesamte Stativ inklusive der Objektive auf, und die dann erreichte thermische Stabilität war günstig für die Einhaltung einer konstanten Fokusebene während des Mikroskopierens. Das über NaHCO₃ gepufferte Medium benötigte eine Begasung mit 5% CO₂. Dazu wurde ein kleinerer Inkubator angefertigt, der direkt auf die Objektträger-Aufnahmen des Verschiebetisches passt (Abb. 11 links). In einer Mischeinheit (Pecon) wurde Raumluft kontrolliert mit CO₂ versetzt, zwecks Anfeuchtung durch eine Gaswaschflasche geleitet und in diesen kleineren Inkubator gepumpt. Die Ibidi-µSlides schließen mit dem Boden dieses Inkubators ab, sodass Mikroskopieren durch den Folienboden möglich ist (Abb. 11 rechts).

3.5.4 Mikroskopsteuerung und Bildverarbeitung

Die Steuerung des Lebendzellmikroskops erfolgte vollautomatisch über die Software MetaCyte von MetaSystems. Dazu wurde in der Software ein Satz von Parametern angelegt, der den Lebendzellmikroskopie-Versuch steuert. Die Parameter beinhalten die Koordinaten der Positionen, die aufgenommen werden sollen, die verwendeten Filterwürfel, die Belichtungszeiten, die Anzahl der Ebenen und deren Abstand, die Anzahl der Zyklen und deren zeitlicher Abstand. Es war auch möglich, spezifische Aufnahmebedingungen für einzelne oder Gruppen von Zyklen oder Positionen zu definieren. Die

aufgenommenen Bilder wurden in einer einzigen, von MetaCyte lesbaren *.TRN Datei gespeichert. Aus dieser Datei wurden die Bilder im Anschluss im JPEG- oder TIFF-Format exportiert. Die Betrachtung und Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software ACDSee (ACD Systems, Ltd.). Mit ihr konnten die Bilder in rascher Folge angeschaut, ordnerweise aufgehellt, verkleinert oder Dateiformate geändert werden. Des Weiteren wurde ImageJ zur halbautomatischen Auswertung von Zeitserien aus der Lebendzellmikroskopie eingesetzt. Das dazu geschriebene Makro automatisiert sich ständig wiederholende Bearbeitungs-Schritte in ImageJ. Der annotierte Code ist im Anhang zu finden. Die genaue Funktionsweise des Makros ist im Ergebnisteil beschrieben. Die Lebendzellmikroskopie-Bilder des GFP-MDC1-Konstruktes wurden dekonvolviert. Dazu wurde die Software Huygens Professional 3.5.1p2 64bit von Scientific Volume Imaging (SVI), eingesetzt.

3.6 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie wurde vor allem zur Untersuchung des G2/M-Checkpoints durch Analyse des mitotischen Index genutzt. Dazu wurden exponentiell wachsende Zelle in 25 cm²-Flaschen bzw. in Schalen mit 6 cm Durchmesser kultiviert und wie unter 3.3 beschrieben bestrahlt.

3.6.1 Zellernte und Fixierung für Durchflusszytometrie

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung wurde das Medium in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, die Zellen mit PBS gewaschen und dann wie unter 3.2.1 beschrieben abtrypsinisiert und zum Medium in das Reaktionsgefäß gegeben. Nach erfolgter Zentrifugation (7 min, 300 g, 4°C) wurde der Überstand verworfen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend zentrifugiert (7 min, 300 g, 4°C). Die Fixierung erfolgte tropfenweise und unter Vortexen mit 2 ml 70%igen eiskaltem Ethanol. Die fixierten Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei - 20°C gelagert.

3.6.2 phospho-H3 / Propidiumiodid-Färbung

Die Bestimmung des mitotischen Index erfolgte anhand eines phospho-spezifischen Antikörpers gegen Histon 3, welches in mitotischen Zellen am Serin 10 phosphoryliert wird.

Dazu wurden die fixierten Zellen 7 min bei 300 x g und 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde erneut mit PBS gewaschen und wie oben zentrifugiert. Zur Permeabilisierung der Zellen erfolgte ein 15minütiger Inkubationsschritt in PBS mit 0,25% TritonX-100 auf Eis. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurden die Zellen nach der Zentrifugation 5 h bei 4°C mit PBS/1% BSA geblockt.

Das nach der Zentrifugation erhaltene Zellsediment wurde über Nacht bei 4°C mit 100 µl Erstantikörperlösung (1:1300) inkubiert. Nach Zugabe von PBS,1% BSA und anschließender 10minütiger Inkubation bei RT wurde erneut zentrifugiert und das Zellsediment 1 h bei RT und unter lichtgeschützten

Bedingungen mit der Zweitantikörperlösung (1:500) inkubiert. Nach erneuter Inkubation mit PBS/1% BSA für 10 min und anschließender Zentrifugation konnte das Zellsediment in 500 µl PI-Lösung resuspendiert und 30 min bei RT unter lichtgeschützten Bedingungen inkubiert werden, bevor die Proben am Durchflusszytometer Cytomics FC500 (Beckman Coulter) anhand des DNA-Gehaltes und des phospho-H3-Signals vermessen werden konnten.

3.7 Quantifizierung von Anaphase-Brücken

Zur Analyse des Anaphasen-Brücken-Index (ABI) wurden Zellen auf Deckgläschen oder in Ibidi-µSlides 48 h vor Versuchsbeginn ausgesät (siehe 3.2.4 und 3.5.1). Da in unbestrahlten U-2 OS-Zellen nur in ca. jeder 3500sten Zelle eine Anaphasen-Brücke zu erwarten war, wurden bei jedem Versuch und für jede Behandlung 4-5 Deckgläschen, bzw. Ibidi-Kanäle ausgesät. Die mitotischen Zellen wurden nach einer phospho-H3 Färbung oder aufgrund ihrer intensiven DAPI-Färbung mit Hilfe der MetaCyte-Software identifiziert. Unter den Mitosen erscheinen Anaphasen als 2 längliche Zellkerne mit einfachem DNA-Gehalt, da die Chromatiden bereits getrennt vorliegen. Auch diese Eigenschaften konnten von MetaCyte zur Diskriminierung genutzt werden. Die Anaphasen wurden nacheinander relokieret und manuell mit einem 100x Plan Neo Fluar Objektiv (Zeiss) auf Brücken untersucht.

4 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das Zusammenspiel zwischen Zellzykluskontrolle und der Reparatur von DNA-DSBs am G2/M-Übergang untersucht werden. In früheren Arbeiten wurde anhand durchflusszytometrischer Methoden und Immunfluoreszenzfärbungen gezeigt, dass die Zellen der G2-Population nach Bestrahlung noch 10-20 DSBs aufweisen, wenn sie in die folgende Mitose eintreten (Deckbar et al. 2007, Krempler et al. 2007). Der G2/M-Checkpoint wird aufgehoben bevor die entstandenen DSBs komplett repariert wurden. Die Lebendzellmikroskopie sollte das Verständnis des Reparatur- und Zellzyklus-Verhaltens in G2 verbessern, indem sie die gemeinsame Messung dieser beiden Größen in lebenden Zellen ermöglicht. Im Verlauf von G2, M und G1 sollte das Verhalten individueller Zellen beobachtet und in Zusammenhang mit der DSB-Reparatur dieser Zellen gebracht werden. Um diese Ziele zu erreichen, sollte im ersten Teil der Arbeit die Lebendzellmikroskopie etabliert und im Hinblick auf die Fragestellung optimiert werden. Nach der Etablierung sollte das Reparatur-Verhalten am G2/M-Übergang charakterisiert und das Schicksal einzelner DSBs untersucht werden, die unrepariert in die Mitose gelangen.

4.1 Etablierung der Lebendzellmikroskopie

Um Zellen in der Lebendzellmikroskopie bezüglich ihres Zellzyklus- und Reparatur-Verhaltens untersuchen zu können, darf die Kultivierung und Beobachtung der Zellen keinen Einfluss auf diese Größen haben. Gerade das Zellzyklusverhalten ist aber sehr empfindlich gegenüber Störungen. So führte z.B. bereits ein leichtes Abkühlen der Kultur zu einem verlangsamten Eintritt in die Mitose. Neben der Temperatur müssen aber auch andere Kultivierungsbedingungen erfüllt sein. Die Lebendzellmikroskopie erfordert ein Behältnis für die zu beobachtende Zellkultur, das für die Mikroskopie geeignet ist und die Verdunstung des Mediums minimiert. Definierte Umweltbedingungen während der Aufnahme beinhalten die Temperatur, die Verhinderung der Austrocknung, einen stabilen pH-Wert im Medium sowie Lichtverhältnisse während der Aufnahme, welche die Zellen nicht schädigen. Die Bedingungen, unter denen die Lebendzellmikroskopie-Versuche durchgeführt wurden, veränderten sich in Details immer wieder. So musste auf Veränderungen der Lampen-Leistung oder der Fluoreszenz-Intensität in den Zellen reagiert werden. Durchgängig wurde versucht, die Aufnahme-Bedingungen und damit die Belastungen für die Zellen konstant und vergleichbar zu halten. Diese typischen Bedingungen bzw. Abläufe sind in Abschnitt 4.1.3 beschrieben. Nach der Aufnahme bedarf es geeigneter Software, um die Filme zu erstellen

und auszuwerten. In allen Bereichen wurden Lösungen gefunden, von denen die wichtigsten im Folgenden beschrieben werden.

4.1.1 Kultivierung und Positionierung der Zellen unter dem Mikroskop

Das Zusammenspiel von Zellzyklusverhalten und DSB-Reparatur sollte in der Osteosarkom-Zelllinie U-2 OS beobachtet werden. Von dieser Zelllinie stand bereits zu Beginn der Arbeit eine Kultur zur Verfügung, in

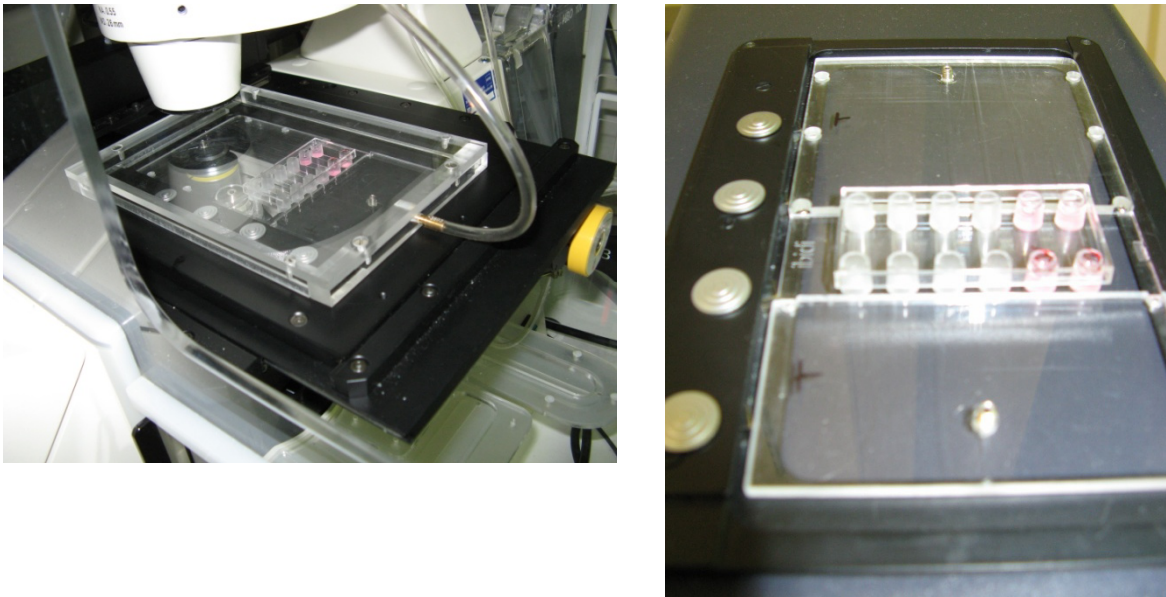


Abb. 11: Inkubator zur gezielten Begasung der Proben auf dem Mikroskoptisch. Der Eigenbau besteht aus einem Acrylglas-Deckel, der passgenau auf dem Verschiebetisch sitzt und durch den die Beleuchtung stattfindet. Der Boden besteht aus kleineren Acrylglas-Segmenten, die in die Objektträgeraufnahmen passen und das sofortige Absinken der seitlich eingeleiteten CO₂-Luft verhindern. Das Ibidi- μ Slide stellt einen Teil des Inkubatorbodens dar.

die ein GFP-53BP1-Konstrukt stabil integriert war (freundlicherweise zu Verfügung gestellt von Claudia Lukas) (Lukas et al. 2004). Um die oben beschriebene Lebendzellmikroskopie durchführen zu können, muss das verwendete Zellkulturgefäß einer Reihe von Ansprüchen genügen. Da es sich bei dem verwendeten Mikroskop Axiovert 200M um ein inverses Mikroskop handelte, mussten die adhären Zellen von unten mikroskopierbar sein. Zudem durfte der Arbeitsabstand nicht zu groß sein, um Objektive mit starken Vergrößerungen einsetzen zu können.

Zunächst wurden die μ Slides VIII der Firma Ibidi getestet. Dabei handelt es sich um acht quadratische Vertiefungen in einem Kunststoffrahmen in Standard Objektträger-Format. Von unten sind die Vertiefungen mit einer Folie verschlossen. Der mitgelieferte Deckel wurde umgebaut, um eine CO₂-Begasung direkt auf das Medium zu realisieren. Dieses μ Slide wurde mit doppelseitigem Klebeband oder reversiblen Kleber in einem beheizbaren Tischeinsatz, dem „Heizeinsatz P“, der Firma Pecon befestigt. Erste Versuche mit diesem Gefäß legten jedoch verschiedene Nachteile offen. Die Verdunstung des

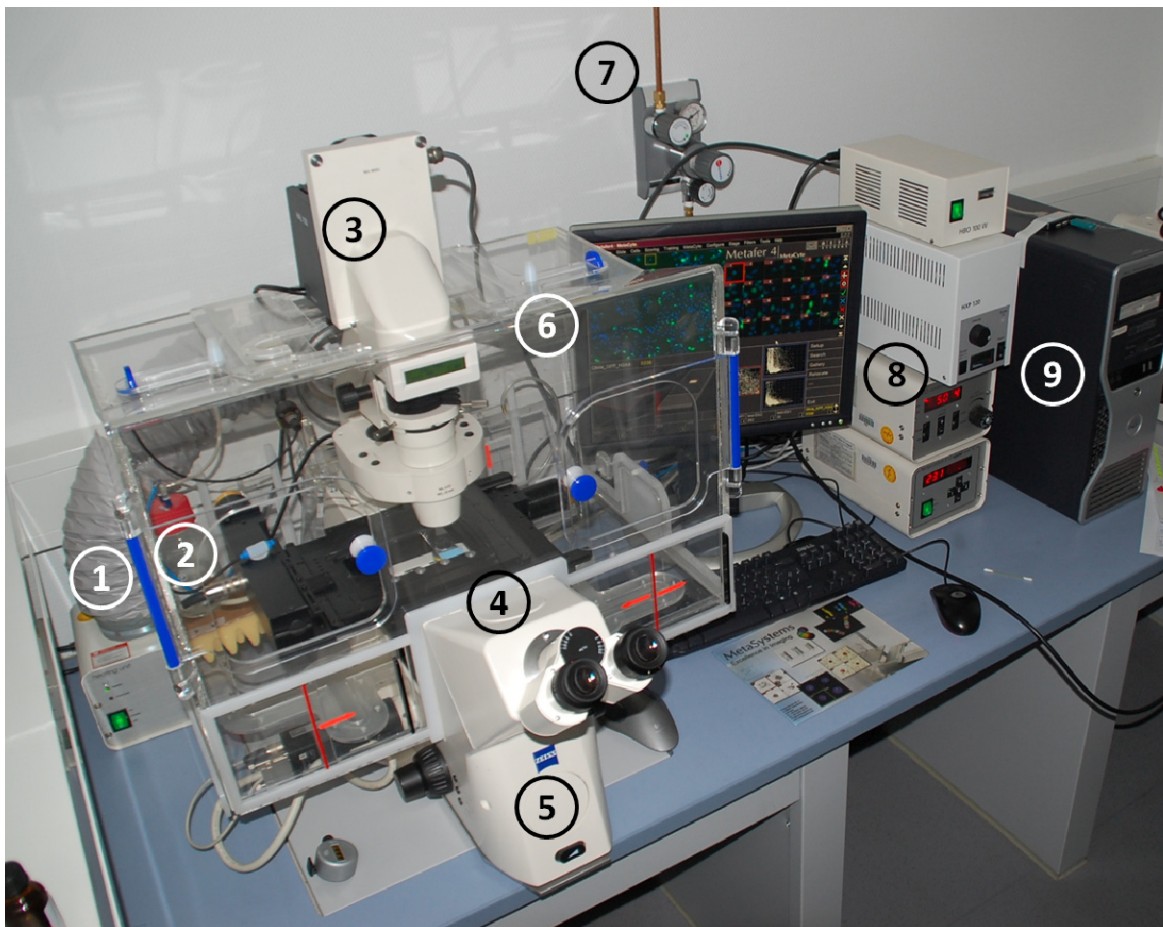


Abb. 12: Das Lebendzellmikroskop. Komponenten: 1. Heizlüfter 2. Gaswaschflasche zur Luftbefeuchtung 3. Durchlicht-Shutter 4. X-Y Verschiebetisch 5. Axiovert 200M 6. Inkubator XL 7. CO₂-Versorgung 8. Steuereinheiten für Temperatur und CO₂, Auflichtlampe 9. Steuerrechner

Mediums bei laufender Begasung war trotz einer zweistufigen Anfeuchtung des CO₂-Luft-Gemisches über Gaswaschflaschen zu stark, wodurch sich zunächst die Salz-Konzentrationen im Medium erhöhten und im Extremfall die Zellen austrockneten. Die Aussaat der Zellen in den Vertiefungen des Gefäßes war extrem ungleichmäßig. Eine Ansammlung der Zellen im Zentrum der Vertiefung war so gut wie nicht zu verhindern. Weiterhin bildete das Medium in der nach oben offenen Vertiefung einen Meniskus aus. In den Randbereichen der Vertiefung stand somit die Oberfläche des Mediums schräg zur Beleuchtung im Durchlicht. Saubere Aufnahmen im Phasenkontrast waren dadurch nicht möglich, und die mikroskopierbare Fläche beschränkte sich auf einen kleinen Bereich in der Mitte des Gefäßes.

Die im Anschluss getesteten μ Slide VI weisen keine offenen Vertiefungen auf, sondern die Zellen wachsen in einem Kanal zwischen zwei Medium-Reservoirs (Abb. 9). Dies beseitigte den großen Nachteil der konvexen Oberfläche des Mediums. Verdunstung findet bei diesen μ Slides nur noch über die nach oben offenen Reservoirs statt. Da die CO₂-Begasung auch per Diffusion durch das Plastik der Kanal-Wände funktioniert, wurde eine direkte Begasung über den Deckel überflüssig, und es wurde wieder der originale

Deckel verwendet. Zur Begasung wurde stattdessen ein kleiner CO₂-Inkubator nach unseren Vorgaben von der Werkstatt des Fachbereichs hergestellt, der exakt auf den 4fach-Scanning-Einsatz des X-Y Verschiebetisches passte (siehe Abb. 11). Die nicht besetzten Positionen des Scanningeinsatzes wurden mit Kunststoffeinsätzen verschlossen. Den Deckel des Inkubators bildet ein Kunststoffrahmen von ca. 10mm Höhe, der die vier Positionen des Scanningeinsatzes umschließt und oben mit einer Plexiglas-Scheibe verschlossen ist. In diesen kleinen Inkubator wurde nun die mit CO₂ angereicherte Luft geleitet und erreichte von oben die Zellkulturgefäße (siehe Abb. 11 links).

Obwohl mit den µSlides VI eine Verdunstung des Mediums nur noch über die Reservoirs stattfinden konnte, war die Befeuchtung der CO₂-Luft nicht ausreichend, um das Medium-Volumen bei langen Versuchen konstant zu halten. Die Lösung war ein Verschließen der Reservoirs. Nach mehreren Versuchen mit Luer-Stopfen und Knetmasse stellte sich Silikon-Öl als geeignet heraus. Nach der Aussaat wurden die Reservoirs mit ca. 15 µl Silikon-Öl überschichtet, und somit waren Versuche bis ca. 60 h möglich.

Die geplanten Versuchsanordnungen beinhalteten ein zwischenzeitliches Entnehmen des Kulturgefäßes mit anschließender Wiederaufnahme der Bildaufnahme. Daher war das exakte Wiedereinsetzen der µSlides Voraussetzung, um einen durchgängigen Film des gleichen Bildausschnittes zu erreichen. Im Scanningeinsatz des Tisches werden die µSlides mit einer Feder gegen drei Anschläge gepresst, wodurch sie sich bei jedem Einsetzen an den gleichen Positionen befinden.

4.1.2 Entwicklung der Mikroskopsteuerung

Die Entwicklung der Lebendzellmikroskop-Steuerung über die Software Metafer der Firma MetaSystems war sukzessive und folgte den Problemstellungen, die während der ersten Versuche auftraten. Dazu wurde die Software durch die Firma MetaSystems um mehrere entscheidende Funktionen erweitert. Das zum Erzeugen eines Films nötige, wiederholte Anfahren mehrerer Positionen wurde implementiert. Dabei kann man die Anzahl der Aufnahmezyklen und die Zeitabstände zwischen den Zyklen wählen. Bei langen Versuchen mit einer Aufnahme von Bildern in mehreren Ebenen und in mehreren Fluoreszenzkanälen entstehen Dateien von bis zu 80 Gigabyte Größe. Aus diesen Dateien müssen die Bilder zur Analyse exportiert werden. Die Fähigkeit, viele tausend Bilder organisiert zu exportieren, wurde der Software ebenfalls hinzugefügt und ein entsprechender Dialog integriert, der das gewünschte Dateiformat, die Bildqualität und die Kompressionsstufe, die Art der Sortierung in Unterordnern oder den evtl. Export einzelner Bilder abfragt. Die Möglichkeit, an definierten Positionen oder Zyklen des Versuchablaufs die Aufnahmeparameter zu variieren, wurde der Software ebenfalls hinzugefügt. Somit konnte z.B. ein Film aus Phasenkontrastbildern erstellt werden, der, um die Probe zu schonen, nur zu ausgewählten Zeiten Fluoreszenzbilder enthält.

4.1.3 Ablauf eines Lebendzellmikroskopie-Versuchs

Ein Lebendzellmikroskopie-Versuch sei hier am Beispiel eines Films zur Aufnahme der Schadensfoci mit einem 40x Objektiv beschrieben. Das Mikroskop und der Inkubator wurden mind. 20 min vor Versuchsbeginn eingeschaltet, damit im System zu Versuchsbeginn stabil 37°C vorliegen. Die CO₂-Begasung wurde ebenfalls vorher eingeschaltet, da sich die Regulation von 5% CO₂ erst einpendeln musste. Unter Verwendung eines speziellen Inkubators (Abb. 10) wurde das µSlide aus dem Brutschrank genommen und auf dem Verschiebetisch im inneren Inkubator positioniert. Dabei musste das Abkühlen des µSlides verhindert werden, da sich gezeigt hatte, dass dies den mitotischen Index stark beeinträchtigt, und die Zellen im Anschluss über 1-2 h verzögert in die Mitose eintreten. Im Anschluss wurde das Mikroskop gekühlt, um die Beleuchtung an die Verwendung des inneren Inkubators anzupassen und hochwertige Phasenkontrast-Aufnahmen zu erreichen. Die Belichtungszeit zur Aufnahme des GFP-gekoppelten 53BP1 bei 6-25% Lampenintensität wurde kurz überprüft und der aktuellen Fluoreszenz-Intensität angepasst. Diese variiert mit der Passagenzahl der Kultur und dem Alter des Kurzbogen-Brenners. Die Belichtungszeit für die Phasenkontrastaufnahmen war bei gegebener Lampenspannung immer gleich für ein Objektiv. Der Parametersatz zur Lebendzellaufnahme wurde bezüglich Belichtungszeiten, Anzahl der Ebenen im Fluoreszenzkanal, Anzahl der Positionen, Zyklen-Zahl und -Dauer angepasst.

Nach dem Start der Aufnahme nimmt das System, gesteuert über den Parametersatz, eine definierte Zahl von Bildfeldern auf, die im Schachbrettmuster nebeneinander liegen, z.B. ein Muster von vier mal fünf Bildfeldern. Dieser Anweisung im Parametersatz folgt das System für jede Position einer zuvor erstellten Positionsliste. Wurden drei Kanäle im µSlides ausgesät, wird eine Positionsliste mit sechs Positionen erzeugt, zwei Positionen pro Kanal. Somit ergeben sich insgesamt 120 Bildfelder, sechs Positionen à 20 Bildfeldern. Für jedes Bildfeld führt das System einen Autofokus durch, bei dem die Fokusebene anhand der größten Kontrastwerte ermittelt wird. Diese Z-Position wird ebenfalls als Zentrum des Bilderstapels im GFP-Kanal übernommen. Dieses Verfahren führt auch bei leichtem Verziehen des µSlides noch zu scharfen Bildern und hat den Vorteil, die Probe nicht stark zu belasten. Ein Autofokus im GFP-Kanal würde die GFP-Belichtungszeit der Probe mehr als verdoppeln, während eine Bildstapelaufnahme im Phasenkontrast eine ungleich kleinere Mehrbelastung darstellt.

Die Zeit, die das System zur Aufnahme der 120 Positionen benötigte, hing von den Belichtungszeiten in den einzelnen Kanälen, vor allem aber von der Anzahl der Ebenen, die zur Aufnahme aller Foci im Fluoreszenzkanal eingestellt sind, ab. Für sechs Ebenen à 125 ms Belichtungszeit und 120 Positionen benötigte das System ca. 10 min. Bei einer Zyklendauer von 900 Sekunden (15 min), wartete das System die restlichen 5 min und startete nach Ablauf dieser Zeit mit dem nächsten Zyklus.

Bei einigen Versuchsansätzen war es notwendig, die Aufnahme zu unterbrechen und die Zellen z.B. zur Bestrahlung aus dem Inkubator zu nehmen. Dazu wurden die µSlides in den Inkubator mit Bleimaske (Abb.

10) überführt, der den Transport und auch die Bestrahlung der Zellen ermöglichte, ohne dass die Zellen eine zu starke Abkühlung erfuhren. Um die Aufnahme ohne Unterbrechung im 15 min-Rhythmus fortzusetzen, musste man die Bestrahlung zweier Dosen (0, 1 und 2 Gy) und das Wiedereinsetzen des μ Slides innerhalb von 5 min bewerkstelligen. Beim Wiedereinsetzen des μ Slides in den inneren Inkubator war auf den korrekten Sitz des μ Slides an den Anschlüssen der Objektträgeraufnahme zu achten. Auch ein zu starkes Kippen des μ Slides, oder ein Verbiegen des relativ weichen Plastiks war zu vermeiden. Dies vorausgesetzt wurden in den verbliebenen Zyklen die identischen Positionen auch weiterhin im Fokus aufgenommen. Die vom System in einer einzigen (*.TRN) Datei abgespeicherten Bilder wurden im Anschluss aus der Metafer-Software heraus geöffnet und im JPEG- oder TIFF-Format exportiert. Die Betrachtung und Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software, ACDSee. Mit ihr können die Bilder in rascher Folge betrachtet und ordnerweise aufgehellt oder verkleinert oder das Dateiformat geändert werden.

4.1.4 Einfluss von Inkubation und Beobachtung auf den Mitotischen Index

Mit dem Ziel das Wachstum der Zellen durch die Inkubation unter dem Mikroskop und durch die Beobachtung nicht zu beeinflussen, stellte sich die Frage nach dem auszuwertenden Endpunkt für entsprechende Kontrollversuche. Dabei erwies sich der mitotische Index (MI) als geeigneter Parameter, der sich leicht über die Zahl der pro h stattfindenden Zellteilungen in den Lebendzellmikroskopischen

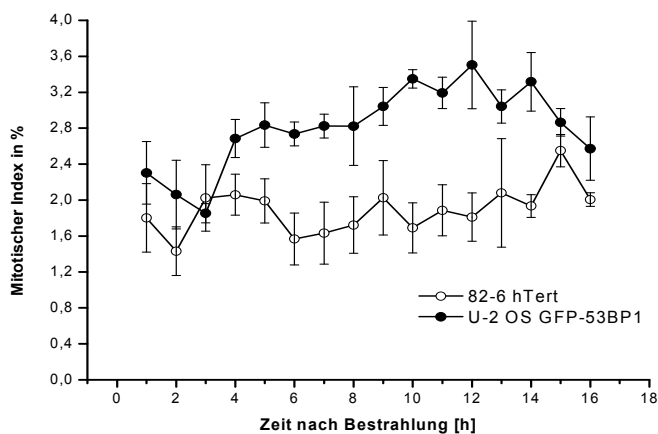


Abb. 13: Oben: In der Lebendzellmikroskopie gemessener Mitotischer Index in den Zelllinien U-2 OS GFP-53BP1 und 82-6 hTert. Die Zellen wurden in geeigneter Dichte 48 h zuvor ausgesät. Während des Versuchs wurde unter Verwendung eines 10x Phasenkontrast Objektivs alle 15 min ein Bild erstellt. In den zu Filmen zusammengestellten Bildern wurde MI bestimmt. Die Fehlerbalken sind die Standardfehler über die durchgeführten Versuche. Unten: Eine Mitose vor und nach der Zytokinese, im Durchlicht mit Phasenkontrast aufgenommen. Für den MI wurde die Zytokinese, die Abschnürung der Zytoplasma-Massen, als morphologisches Merkmal der Mitose gewertet.



Aufnahmen auswerten ließ, und bereits auf geringe Schwankungen in den physiologischen Bedingungen reagierte. So führte z.B. ein kurzzeitiges Abkühlen der Zellen in den μ Slides während der Entnahme aus dem Inkubator zu einem deutlichen Einbruch im MI. Auch über längere Zeiträume (>10 h) ist der MI ein geeigneter Endpunkt, da er nur konstant hoch bleiben kann, wenn die Zellen in keiner der vorherigen Zellzyklusphasen eine Verzögerung erfahren. Abb. 13 zeigt den MI von U-2 OS-Zellen bei Beobachtung im Phasenkontrast-Modus über 16 h. Durch den Transport der Zellen in die Inkubationskammer des Mikroskops stagniert der MI zum Beginn der Messung, und verläuft dann in einem Bogen mit dem Maximum gegen Ende der Messung. Solange die Kultur noch nicht konfluent ist steigt der MI, um dann nach Erreichen der Konfluenz (Stunde 14-15) wieder abzufallen. Diese Abhängigkeit des MI von der Dichte der Kultur wurde in allen Versuchen beobachtet. Die Messung des MI in 82-6 hTert-Zellen wurde zur Kontrolle durchgeführt, um die Ergebnisse der Tumorzelllinie mit einer primären Zelllinie zu vergleichen. 82-6 hTert-Zellen zeigen den gleichen Effekt zum Beginn der Messung, liegen dann jedoch stabil bei knapp 2%. Der MI der U-2 OS-Zellen liegt generell höher als in der 82-6 hTert-Linie, da sie als Tumor-Zellen schneller proliferieren.

Neben der Inkubation und der Erstellung von Aufnahmen im Durchlicht ist die Aufnahme von Fluoreszenzbildern die maßgebliche Belastung bei der Lebendzellmikroskopie. Es muss sehr starkes Licht eingesetzt werden, um die Fluorophore anzuregen, aber nur ein geringer Teil dieser Energie wird als Fluoreszenz wieder abgegeben. Die Mehrzahl der Photonen regt andere Strukturen in der Zelle, z.B. Wasser an. Die dabei entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies schädigen eine ganze Reihe anderer Strukturen in der Zelle, z.B. DNA, Proteine oder Membranen. Diese Folgen der Belichtungen werden als Phototoxizität bezeichnet (Dixit und Cyr 2003, Hsi et al. 1999, Martin et al. 2005, Vrouenraets et al. 2003).

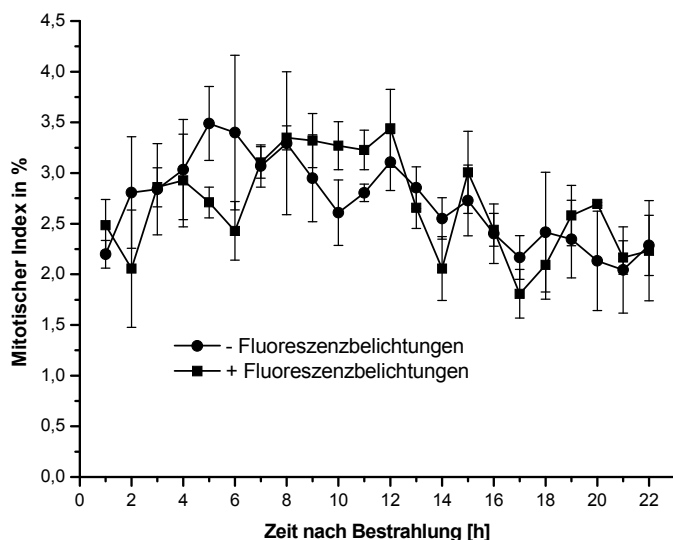


Abb. 14: In der Lebendzellmikroskopie gemessener Mitotischer Index in U-2 OS GFP-53BP1 Zellen. 48 h zuvor wurden $2,2 \cdot 10^5$ Zellen pro Kanal ausgesät. Unter Verwendung eines 40x Objektivs wurde alle 15 min ein Zyklus Phasenkontrastbilder, sowie von der Hälfte der Positionen Fluoreszenzbilder bei der Anregungswellenlänge 470 nm aufgenommen. Belichtet wurde 160 ms in sechs Ebenen, bei 6% Intensität der HBO-Lampe. Die Fehlerbalken sind der Standardfehler über 5 Versuche.

Neben der Belichtungsintensität ist die Phototoxizität abhängig von der Frequenz der Bildaufnahme, den Belichtungszeiten und der Anzahl der aufgenommenen Ebenen. Phototoxizität kann Einfluss auf den Zellzyklus haben, die DNA schädigen und kann sogar zum Zelltod führen. Um auf phototoxische Effekte durch die Aufnahmen zu kontrollieren, wurde der MI von Zellen, die lediglich im Durchlicht aufgenommen wurden, mit dem MI von Zellen verglichen, die zusätzlich im Fluoreszenzmodus aufgenommen wurden (Abb. 14). Die Aufnahmebedingungen wurden für diesen Versuch so gewählt, dass die maximale, bei späteren Versuchen zur Untersuchung des G2/M-Checkpoints mögliche Belastung entsteht. Die Bilder wurden im Abstand von 15 min aufgenommen. Die Bilder wurden in sechs Ebenen mit einem Abstand von 800 nm aufgenommen. Der resultierende Bildstapel hat somit eine Höhe von knapp 5 μm , was knapp der Höhe der adherenten Zellen entspricht. Bei einem Objektiv mit der Numerischen Apertur von 0,75 entsprechen 800 nm Abstand zwischen den Bildebenen der Nyquist-Rate, also der rechnerisch erforderlichen Sampling-Dichte, um alle Informationen des Bildes zu erfassen. Als Belichtungszeit wurden 160 ms gewählt, die bei 6% Intensität der HBO-Lampe für ein gutes Foci-Signal reichten. In späteren Versuchen wurde versucht, Belichtungszeiten zwischen 80 und 160 ms zu benutzen, um vergleichbare Aufnahme-Bedingungen zu haben. Bei schlechterem Zustand der Lampe waren dafür mitunter auch 25% der Lampenintensität nötig. Der MI mit und ohne Fluoreszenzaufnahmen in Abb. 14 zeigt einen konstanten Verlauf für die Dauer des Versuchs. Unterschiede zwischen den beiden Bedingungen zeigen keinen einheitlichen Trend und sind auch nicht signifikant. Dies zeigt, dass die Belastung unter den gewählten Aufnahme-Bedingungen so gering ist, dass sie sich nicht auf das Zellzyklus-Verhalten der Zellen auswirkt.

4.1.5 Einfluss von Inkubation und Beobachtung auf das Reparaturverhalten

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die DSB-Reparatur in lebenden Zellen untersucht werden. Daher war es wichtig, einen geeigneten Marker für DSBs zu haben, dessen Beobachtung jedoch nicht zur Induktion von DNA-Schäden führt oder auf andere Weise die Reparatur von DSBs beeinflusst. Als DSB-Marker wurde ein GFP-53BP1-Konstrukt gewählt. 53BP1 akkumuliert innerhalb von wenigen Minuten am Schadensort und

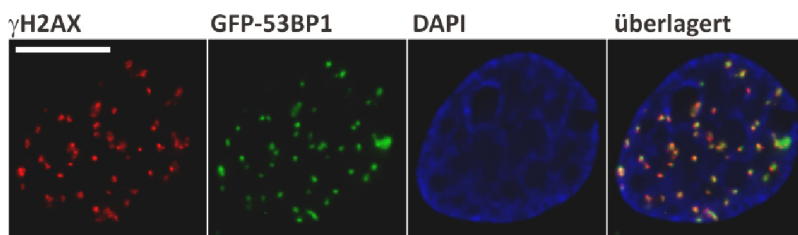


Abb. 15: Aufnahme einer U-2 OS GFP-53BP1 Zelle. Die Zelle wurde 30 min nach 1 Gy Bestrahlung fixiert und Immunofluoreszent gefärbt. Im roten Kanal sieht man γH2AX , im grünen das GFP-53BP1. In blau ist die Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI zu sehen. Die Aufnahme erfolgte mit einem 100x Objektiv in 25 Ebenen mit 300nm Abstand. Die resultierenden Bilderstapel wurden dekonvolviert. Der Größenstandard entspricht 10 μm .

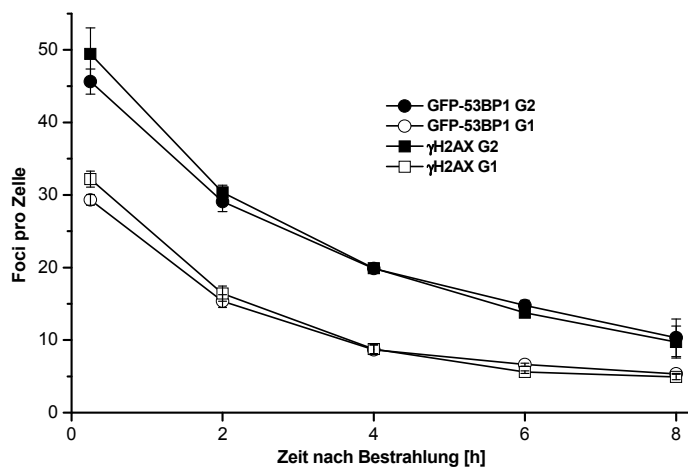


Abb. 16: Quantifizierung von GFP-53BP1- und γ H2AX-Foci nach 1 Gy. Die U-2 OS-Zellen wurden 48 h vor der Bestrahlung in geeigneter Dichte auf Deckgläschen ausgesät, so dass sie zum Zeitpunkt des Versuchs exponentiell wachsen. Nach Bestrahlung und Zugabe von Aphidicolin wurden die Zellen zu verschiedenen Zeiten fixiert und γ H2AX immunfluoreszent gefärbt. Die Auswertung der γ H2AX- und der GFP-53BP1-Foci fand unter Verwendung eines 100x Objektivs am Mikroskop statt, und nicht, wie später in der Lebendzellmikroskopie, am Computer-Bildschirm. Die Fehlerbalken sind die Standardfehler über die ausgewerteten Versuche.

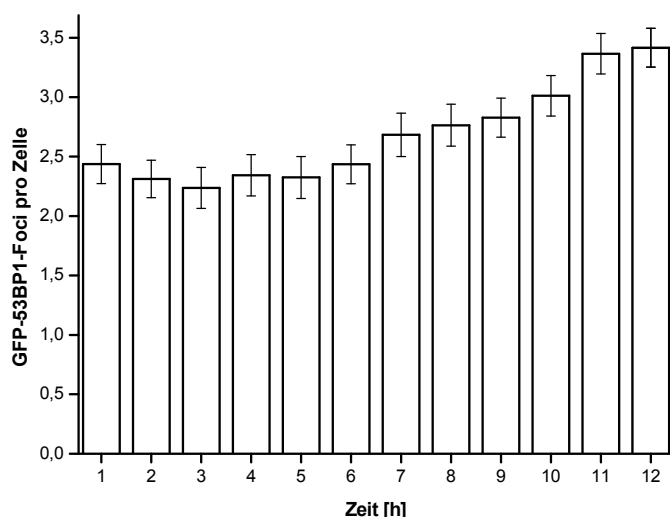


Abb. 17: Spontane Foci aus U-2 OS GFP-53BP1 Zellen in der Lebendzellmikroskopie. $2,2 \cdot 10^5$ Zellen wurden 48h zuvor pro Kanal in einem μ Slide ausgesät. Unter Verwendung eines 40x Objektivs wurden alle 15 oder 30 Minuten Fluoreszenz-Aufnahmen der GFP-53BP1-Foci gemacht. Die Aufnahmen wurden zu Filmen sortiert und in ihnen die Focizahl proliferierender Zellen ermittelt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler über durchschnittlich 140 Zellen dar.

kolokalisiert in der Interphase mit γ H2AX (Abb. 15). Das Protein ist als Schadensmarker etabliert und kann äquivalent zu γ H2AX zur Charakterisierung des Reparaturvermögens verwendet werden (Schultz et al. 2000). Um zu untersuchen, ob sich die DSB-Reparatur mittels GFP-53BP1 messen lässt, wurden exponentiell wachsende U-2 OS GFP-53BP1 Zellen mit 1 Gy bestrahlt und nach unterschiedlichen Reparaturzeiten fixiert. Nach einer Immunfärbung gegen γ H2AX und der Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI wurden die Zellen anhand ihres DNA-Gehalts als G1 und G2, sowie S-Phase-Zellen identifiziert und die enthaltenen Foci gezählt. Dabei wurden zum einen γ H2AX-Foci, zum anderen GFP-53BP1-Foci ausgezählt und die Reparaturkinetiken gegenübergestellt (Abb. 16). Generell unterscheiden sich G1- und G2-Phase-Zellen durch die Anzahl der induzierten Foci. Da G2-Zellen einen im Vergleich zu G1 verdoppelten DNA-Gehalt besitzen, werden in ihnen auch ca. doppelt so viele DSBs durch 1 Gy erzeugt.

Fixiert man die Zellen zu späteren Zeiten nach Bestrahlung haben die Zellen bereits einen Teil der DSBs repariert, und man zählt eine geringere Anzahl Foci in den Zellen. Vergleicht man die beiden ausgewerteten Schadensmarker sind unter diesen Bedingungen keine Unterschiede zu erkennen, sowohl was die Induktion, als auch was die Reparaturkinetik betrifft.

Um zu untersuchen, ob die Inkubation und die Beobachtung in der Lebendzellmikroskopie DSBs induziert, wurden spontane GFP-53BP1-Foci in lebenden U-2 OS-Zellen quantifiziert. Die Aufnahmen erfolgten mit einem 40x Objektiv im Abstand von 30 min (Abb. 17). Da der G2/M-Übergang im Zentrum des Interesses stand, wurden Zellen ausgewertet, die sich im Laufe des Versuchs teilten. Die Foci-Kinetiken der einzelnen Zellen wurden gemittelt. Nach Beginn der Aufnahme zeigte sich zunächst ein stabiler Verlauf der mittleren Zahl spontaner Foci. Ab ca. 6 h Beobachtung war eine leichte Erhöhung der Zahl spontaner Foci von $\sim 2,4$ auf $\sim 3,3$ Foci nach 12 h sichtbar, was auf eine Induktion von Foci durch die Beobachtung hindeuten könnte.

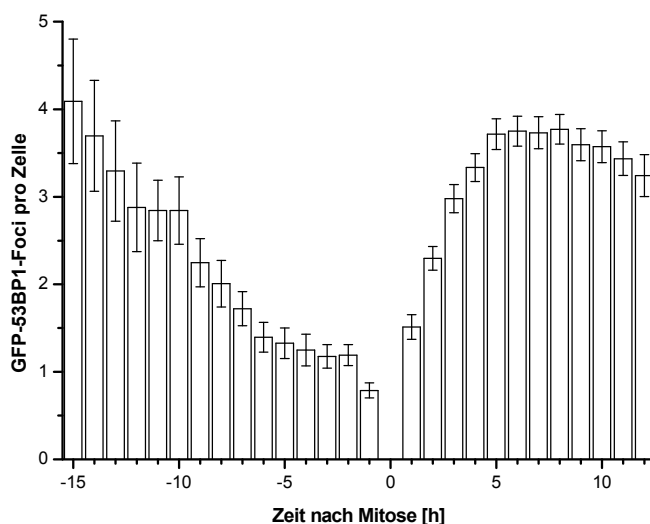


Abb. 18: Spontane Foci aus U-2 OS GFP-53BP1-Zellen in der Lebendzellmikroskopie, sortiert nach dem Zeitpunkt der Mitose. Aus den Focizahlen der Zellen in Abb. 17 wurde ein Zellzyklusphase spezifischer Hintergrund erstellt indem die Daten anhand der Mitose aneinander ausgerichtet wurden. Bis zu 170 Zellen wurden pro Zeitpunkt ausgewertet, an den Rändern der Kinetik flossen weniger Zellen ein. Die Fehlerbalken sind der Standardfehler über die ausgezählten Zellen.

Eine andere Aufbereitung der Daten zeigte jedoch den wahren Grund auf. In die Auswertung spontaner Foci am G2/M-Übergang (Abb. 17) flossen proliferierende Zellen ein, also Zellen, die sich im Laufe des Versuchs teilten. Beachtet man die sich ändernde Zellzyklusphase dieser Zellen und richtet die Foci-Kinetiken der einzelnen Zellen anhand des Mitose-Beginns (Prophase) aneinander aus, erhält man die mittlere Zahl spontaner Foci zu definierten Zeitpunkten vor oder nach der Mitose. Es ergibt sich eine Kinetik spontaner Schäden durch den Zellzyklus (Abb. 18). Durch diese Kinetik wurde eine Zellzyklus-abhängige Veränderung der Anzahl spontaner Foci sichtbar. Vor der Mitose nimmt die Zahl der Foci ab, um nach der Mitose wieder anzusteigen. Die Reduzierung der Foci in den Stunden vor der Mitose ist wahrscheinlich der Reparatur der durch die Replikation entstandenen DSBs zuzuschreiben. Während der letzten Stunden in G2 stabilisiert sich die Anzahl spontaner Foci bei ca. 1,3 Foci pro Zelle. Während der

Mitose ist das GFP-53BP1 nicht länger am DSB lokalisiert, so dass in dieser Phase keine Foci detektiert werden können. Die rasche Abnahme der Signalstärke in der Prophase beeinflusst auch den letzten Wert vor der Mitose, bei dem der Foci-Level abrupt auf 0,8 abfällt. Die Länge der Mitose wurde hier pauschal mit einer Stunde veranschlagt, was dem Mittel der individuell schwankenden Mitoselänge entspricht. In der frühen G1-Phase akkumuliert das GFP-53BP1 wieder am DSB, und die Focizahl nimmt über einen Zeitraum von 4-5 h zu. Die höhere Zahl spontaner Foci in G1 Zellen erklärt die steigende Tendenz in Abb. 17.

Überraschenderweise waren nach der Mitose mehr Foci vorhanden als in G2, obwohl die Zellen mit der Mitose ihr genetisches Material halbieren und somit halb so viele DSBs pro Zelle zu erwarten gewesen wären. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt nur bei U-2 OS-Zellen auftritt oder ein generelles Phänomen darstellt, wurde der Versuch in ähnlicher Weise in einer Fibrosarkoma-Zelllinie HT1080 durchgeführt, die

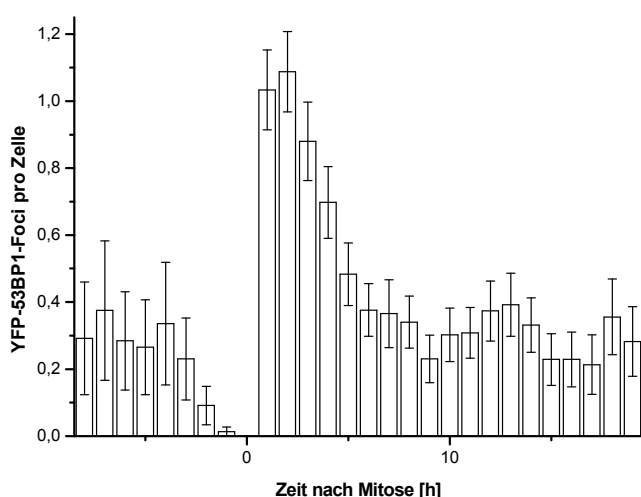


Abb. 19: Spontane Foci aus HT 1080 YFP-53BP1 Zellen. Foci-Daten aus der Lebendzellmikroskopie wurden nach dem Zeitpunkt der Mitose sortiert. Versuchsdurchführung und Darstellung sind analog zu Abb. 17 und Abb. 18. Die Daten entstammen einem einzelnen Versuch mit bis zu 45 Zellen pro Zeitpunkt, an den Rändern der Kinetik flossen weniger Zellen ein. Die Fehlerbalken sind der Standardfehler über die ausgezählten Zellen.

ein YFP-53BP1-Konstrukt exprimiert (Abb. 19). Auch hier wurden in der G1-Phase mehr Foci gemessen als in G2. Die entstandenen Foci wurden jedoch schneller wieder repariert und die Anzahl spontaner Brüche ist niedriger

4.1.6 Schwankungen der Signalqualität von GFP-53BP1 im Zellzyklus

Da während der Mitose das GFP-53BP1 nicht am DSB lokalisiert war, fiel die Interpretation der Foci-Daten direkt vor und nach der Mitose schwer. Es blieb unklar, ob die Abnahme der Foci-Zahlen in spät G2 den tatsächlichen DSB-Level widerspiegelte oder auf Unterschiede in der Detektierbarkeit von GFP-53BP1-Foci zurückzuführen war. Um die Signalqualität in den verschiedenen Zellzyklusphasen quantifizieren zu können, wurden die vorhandenen, für die Foci-Quantifizierung verwendeten Filme mit der Software

ImageJ ausgewertet. Dafür wurde ein Macro (kurzes, in spezieller Sprache geschriebenes Programm zur Automatisierung von ImageJ-Befehlen) geschrieben, welches die Stapelaufnahmen zu Maximum-Intensitäts-Projektionen (MIPs) verarbeitet. Die MIPs wurden zu Zeit-Serien zusammengefügt, um die Entwicklung der Signalqualität über die Zeit zu untersuchen. Zu jedem Zeitpunkt der Aufnahmenserie wurden zwei Parameter gemessen: (i) Aus den Pixelintensitäten eines Nukleus wurde ein Histogramm erstellt und der häufigste Intensitätswert als Hintergrundintensität definiert. (ii) Der Anwender markiert manuell die im Nukleus sichtbaren Foci, woraufhin die maximale Signalintensität jedes Fokus gemessen wird. Die Intensitätswerte der vorhandenen Foci wurden gemittelt und zusammen mit der Hintergrundintensität in einer Liste abgespeichert. Die Werte aller ausgewerteten Filme wurden später gemittelt. Nach dem Ausrichten der Datensätze anhand der Mitose konnte die Entwicklung von Hintergrunds- und Signalintensität gegen die Zeit relativ zur Mitose aufgetragen werden (Abb. 20). In G2 wurde lediglich ein kleiner Intensitätsunterschied zwischen Signal und Hintergrund deutlich. Dieser

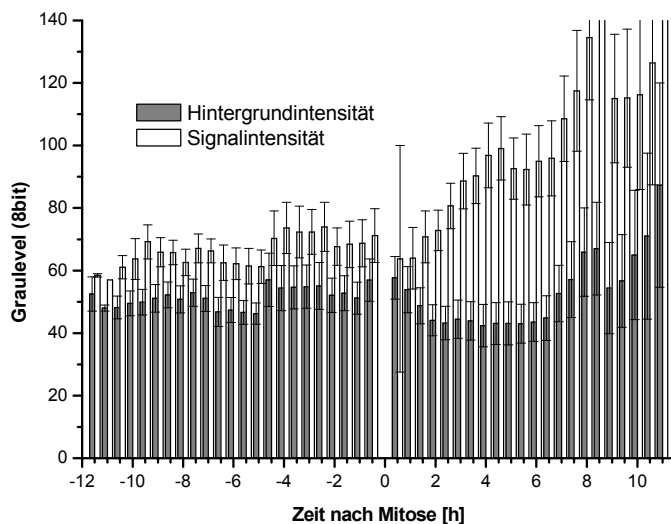


Abb. 20: Quantifizierung der Signal- und Hintergrundintensität im Nukleus von U-2 OS GFP-53BP1 Zellen nach Schadensinduktion mit 1 Gy. Der Versuchsablauf ist ansonsten analog zu Abb. 17 und Abb. 18. Gemessen wurden Intensitäten in Maximum-Intensitäts-Projektionen der Stapelaufnahmen mit einem 40x Objektiv. Der Hintergrund ist definiert als häufigster Intensitätswert. Die Signalintensität ist das Mittel der Maximalintensitäten der manuell definierten Foci pro Zeitpunkt. Als Fehlerbalken sind die Standardfehler über bis zu 26 ausgewerteten Zellen aufgetragen.

geringe Kontrast ist auf die gewählten, schonenden Aufnahmebedingungen zurückzuführen. Nachdem die Zelle die Mitose ohne Foci-Signal durchwandert hat, werden in G1 wieder Foci ausgebildet. Diese nehmen über 4-5 h deutlich an Intensität zu, während in der Hintergrundintensität ein leichter Rückgang zu verzeichnen ist. In der Summe verbessert sich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis, und es ergibt sich ein prägnanteres Foci-Bild in G1. Diese Beobachtung deckt sich mit Erfahrungen aus der Immunfluoreszenz-Mikroskopie, in der die gleichen Unterschiede in der Signalqualität zwischen G1- und G2-Phase existieren. Diese Messungen zeigen, dass in G2 das Signal-zu-Rausch-Verhältnis konstant bleibt, wodurch auch die Bedingungen zur Detektion von Foci zu jedem Zeitpunkt konstant bleiben. Ein Rückgang der Foci-Zahlen ist also auf die Reparatur der DSBs zurückzuführen und nicht auf eine schlechtere Detektierbarkeit der Foci.

Das in G1 kontinuierlich stärker werdende Signal innerhalb der ersten 5 h nach Mitose deckt sich jedoch mit der steigenden Anzahl spontaner Foci in diesem Zeitraum (Abb. 18), so dass es hier zu einer Unterschätzung der tatsächlichen DSB-Zahl in der frühen G1-Phase kommen könnte.

4.1.7 Das GFP-53BP1-Signal in der frühen G1-Phase

Die Untersuchung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses ergab, dass Foci in G2 bis zum Eintritt in die Prophase verlässlich detektierbar sind. Die Signalqualität in der frühen G1-Phase unterliegt hingegen einer starken Änderung und wird über 5 h hinweg besser. Es war davon auszugehen, dass sich diese Änderung auch auf das Zählen von Foci auswirkt. Zur weiteren Überprüfung der in G1 gefundenen Foci-Zahlen wurden Lebendzellaufnahmen gemacht, um die Zellen im Anschluss zu fixieren und 53BP1 sowie γ H2AX immunfluoreszent anzufärben. Anhand des zugehörigen Films konnte man zu jeder Zelle bestimmen, ob sie sich zuvor geteilt hatte und sie somit eine G1-Zelle darstellt. Man konnte die in der IFM gezählten Foci sogar exakt der Zeit zuordnen, die sich die Zelle bereits in G1 aufhält. Der Vergleich der Anzahl spontaner GFP-53BP1-Foci in der Lebendzellmikroskopie einerseits sowie mittels Immunfluoreszenz gefärbter 53BP1- und γ H2AX-Foci andererseits zeigte Unterschiede in der frühen G1-Phase auf (Abb. 21). Die Zellen beinhalten über die ersten 5 h nach der Mitose konstant ~ 4 γ H2AX-Foci. Für GFP-53BP1 und 53BP1 existierten in der ersten Stunde keine Daten, da dort keine Foci verlässlich zu zählen waren. In Abb. 18 bis Abb. 20 existiert eine Foci-Zahl für das erste Bild nach Mitose, da Zellen ohne Foci nicht in den Mittelwert eingeflossen sind, bzw. die im ersten Bild nach der Mitose vorhandenen Signale anhand der Bilder

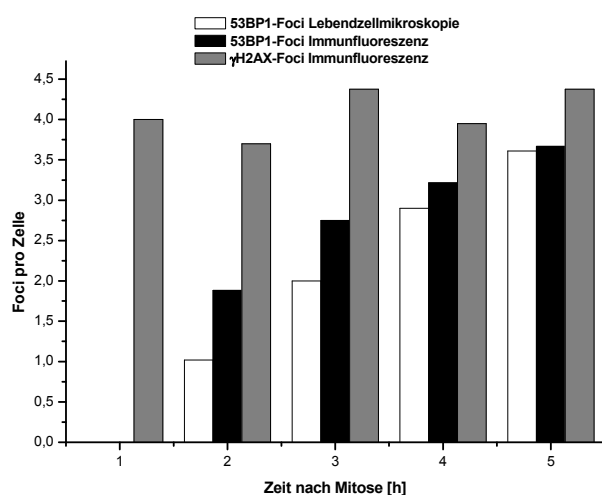


Abb. 21: Quantifizierung von spontanen Foci in frühen G1-Phase-Zellen. 48 h nach Aussaat wurden Lebendzellmikroskopische Aufnahmen in 30 min-Abstand mit einem 40x Objektiv im Durchlicht erstellt. Zuletzt wurde eine Aufnahme der GFP-53BP1 Foci mit 125 ms Belichtung aufgenommen. Im Anschluss wurde die Zellen fixiert und 53BP1 als auch γ H2AX immunfluoreszent gefärbt. Mit einem 63x Objektiv wurden die in der Lebendzellmikroskopie verwendeten Positionen reloziert und in mehreren Ebenen aufgenommen. Über die Lebendzell-Filme konnte im Nachhinein der zeitliche Abstand jeder Zelle zur letzten Mitose bzw. hier der Zytokinese, bestimmt werden. GFP-53BP1-Foci aus der Lebendzellmikroskopie, immunfluoreszente 53BP1- und γ H2AX-Foci wurden am Computer-Bildschirm gezählt und als Funktion ihrer zeitlichen Position nach Mitose dargestellt.

folgender Aufnahmezyklen überprüft werden konnten. In den Versuchen für Abb. 21 war dies jedoch nicht

möglich, sodass die Bilder 1 h nach Mitose generell nicht ausgewertet wurden. Ab 2 h nach Mitose stieg die Zahl an 53BP1- und GFP-53BP1-Foci an. Bei 1 GFP-53BP1-Fokus und 1,75 53BP1-Foci startend nähern sich beide Kinetiken bis 5 h nach Mitose dem γ H2AX-Wert von 4 Foci an. In der Lebendzellmikroskopie wurden konstant weniger Foci detektiert als in den Immunfärbungen der gleichen Zellen. Die Differenz in den 53BP1-Kinetiken (GFP und IF) ist auf diese Sensitivitätsunterschiede zwischen Lebendzellmikroskopie und klassischer Immunfluoreszenzmikroskopie zurückzuführen. Die in Abb. 18 zuerst niedrigen 53BP1- und GFP-53BP1-Foci-Zahlen in der G1-Phase sind auf die noch zunehmende Akkumulation von 53BP1 am Schadensort zurückzuführen. H2AX hingegen liegt auch während der Mitose phosphoryliert am Schadensort vor und muss nicht erst rekrutiert werden (Giunta et al. 2010). 53BP1-Foci unterschätzen somit die Anzahl von DSBs in der frühen G1-Phase.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass das etablierte Lebendzellmikroskopie-System zur Untersuchung von Schadens-Foci und Zellzyklusverhalten geeignet ist. Es wurden Aufnahmebedingungen gefunden, die sowohl im Durchlicht- als auch im Fluoreszenz-Modus die Zellen nicht schädigen oder beeinflussen. Mit Ausnahme der Mitose und frühen G1-Phase kolokalisiert der verwendete Schadensmarker GFP-53BP1 mit γ H2AX und spiegelt auch den gleichen Schadenslevel wider. Die in der Lebendzellmikroskopie verwendeten, schonenden Aufnahmebedingungen führen jedoch generell zur Detektion einer kleineren Zahl an Foci.

4.2 Reparatur und Zellzyklus-Regulation nach Bestrahlung am G2/M-Übergang

4.2.1 Der G2/M-Checkpoint in U-2 OS Zellen

Die Lebendzellmikroskopie bietet die Möglichkeit, gleichzeitig die Reparatur in einer Zelle und ihr individuelles Zellzyklusverhalten zu beobachten. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Reparatur in G2 und die Regulation des G2/M-Checkpoints untersucht werden. Daher musste zunächst sichergestellt werden, dass die U-2 OS GFP-53BP1-Zellen in erwarteter Weise einen G2/M-Checkpoint initiieren und auch wieder aufheben. Um dies zu kontrollieren, wurde das Checkpoint-Verhalten einer großen Population U-2 OS GFP-53BP1-Zellen in der Lebendzellmikroskopie untersucht und die Ergebnisse mit klassischen Methoden validiert. Die Zellen wurden mit einem 10x Objektiv im Durchlicht über zwei Stunden aufgenommen und anschließend bestrahlt oder unbestrahlt gelassen, wobei die unterschiedlichen Dosen in unterschiedlichen Kanälen des gleichen μ Slides appliziert wurden. Im Anschluss wurde die Bildaufnahme der identischen Positionen über 10 h fortgesetzt und die entstandenen Bilder zu Filmen zusammengesetzt. Der MI wurde in der Lebendzellmikroskopie als Quotient aus abgeschlossenen Mitosen pro Stunde und der Gesamtzellzahl definiert (Abb. 22).

Der MI der unbestrahlten Population zeigt 1 h nach Bestrahlung einen geringfügigen Abfall. Da auch diese Kultur aus dem Mikroskop entnommen wurde ist diese Störung im MI ablesbar. Der Abfall des MI erfolgt erst 1 h nach der Entnahme aus dem Mikroskop, da als Mitose die Zytokinese, gewertet wurde (Abb. 13 unten und Film im Anhang 7.4.1). Aktivieren G2-Zellen einen Checkpoint und treten nicht weiter in die Mitose ein, können trotzdem ca. 1 h lang noch Zellen die Mitose verlassen (Film im Anhang 7.4.2). 4 h nach der simulierten Bestrahlung steigt der MI der unbestrahlten Zellen sogar über das vorherige Niveau hinaus an (Abb. 22). Der MI kann im Laufe eines Versuches ansteigen, da mit steigender Dichte die optimalen Wachstumsbedingungen erreicht werden. Konfluente Zellkulturen zeigen wieder einen niedrigen MI.

Der MI der mit 1 Gy bestrahlten Zellen bleibt 1 h nach Bestrahlung unverändert und fällt in der 2. Stunde nach Bestrahlung auf 30-40% des Ausgangswertes ab. 4 h nach 1 Gy steigt der MI wieder an und übersteigt nach 5 h durch den Stauungseffekt am Checkpoint das Ausgangsniveau. Nach 2 und 5 Gy setzt der Checkpoint vergleichbar schnell ein, allerdings fällt der MI stärker ab, d.h. ein größerer Anteil der Zellen initiiert den G2/M-Checkpoint. Darüber hinaus wird der Checkpoint länger aufrecht erhalten. Während nach 1 Gy der Zeitpunkt der Checkpoint-Aufhebung in dem Zeitfenster von 3-5 h nach Bestrahlung noch recht gut ablesbar ist, erholt sich der MI nach 2 Gy über einen Zeitraum von 5 h, um 9 h nach Bestrahlung wieder das Ausgangsniveau zu erreichen. Nach 5 Gy bleibt der MI lange Zeit niedrig und erholt sich innerhalb des Beobachtungszeitraumes kaum.

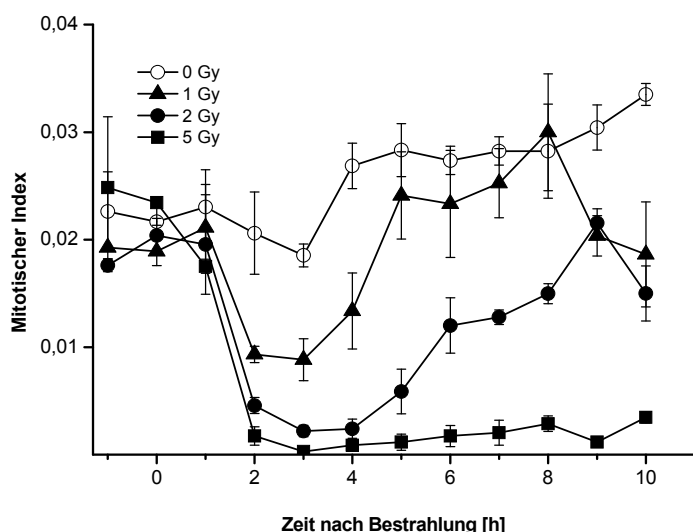


Abb. 22: Mitotischer Index in U-2 OS GFP-53BP1. Die Zellen wurden 48 h vor Versuchsbeginn ausgesät. 2 h nach Beginn der Beobachtung mit einem 10x Objektiv im Durchlicht wurden die Zellen mit 0, 1, 2 und 5 Gy bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde die Beobachtung der gleichen Positionen fortgesetzt. Die Aufnahmen wurden zu Filmen zusammengestellt und die Zellen als auch die Mitosen pro Position gezählt. Die Fehlerbalken sind der Standardfehler über mind. 3 Versuche à 3000 Zellen.

Es konnte also gezeigt werden, dass U-2 OS-Zellen nach Bestrahlung einen G2/M-Checkpoint initiieren. Das Einsetzen des G2/M-Checkpoints erfolgt nach allen 3 Dosen gleich schnell. Mit der Dosis verlängert

sich jedoch die Aufrechterhaltung des Checkpoints, und die Zahl der in G2 aufgehaltenen Zellen scheint auch mit der Dosis zu steigen.

Da die G2-Phase den kürzesten Abschnitt der Interphase darstellt, war fraglich, ob das Ansteigen des MI bei Checkpointaufhebung nur auf den Wiedereintritt von G2-bestrahlten Zellen in die Mitose zurückzuführen ist, oder ob auch in S bestrahlte Zellen zu diesem Zeitpunkt den Checkpoint aufheben. Um dies zu untersuchen, wurde direkt nach der Bestrahlung Aphidicolin zu den Zellen gegeben. Über die Inhibition der an der Replikation beteiligten Polymerasen hindert Aphidicolin die S-Phase-Zellen am Beenden der Replikation und somit am Übertritt nach G2 (Abb. 23). Die Folge ist bei den unbestrahlten Zellen eine beständig kleiner werdende G2-Population, die sich mit der Zeit auch in einen kleiner werdenden MI übersetzt. Nach Bestrahlung sinkt der MI identisch zu Proben, die nicht mit Aphidicolin

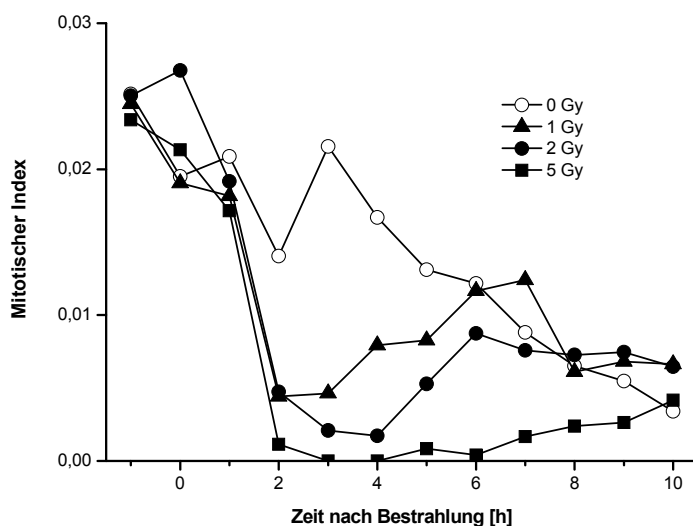


Abb. 23: Mitotischer Index in U-2 OS GFP-53BP1. Die Zellen wurden 48h vor Versuchsbeginn ausgesät. 2h nach Beginn der Beobachtung mit einem 10x Objektiv wurden die Zellen mit 0, 1, 2 und 5 Gy bestrahlt und Aphidicolin zugegeben. Nach der Bestrahlung wurde die Beobachtung der gleichen Positionen fortgesetzt. Die Aufnahmen wurden zu Filmen zusammengestellt und die Zellen als auch die Mitosen pro Position gezählt.

behandelt wurden, innerhalb von 2 h ab. Die Aufhebung des Checkpoints findet ebenfalls zu denselben Zeitpunkten statt, jedoch geht der MI nicht ganz so hoch. Der hohe MI in Proben ohne Aphidicolin kommt also nicht nur durch G2-bestrahlte Zellen, sondern auch durch S-bestrahlte Zellen zustande. Dieser Umstand muss in zukünftigen Versuchen ohne Aphidicolin berücksichtigt werden.

Die in der Lebendzellmikroskopie verwendeten U-2 OS-Zellen sind als Checkpoint-profizient beschrieben (Nghiem et al. 2001), und es konnte hier auch gezeigt werden, dass sie einen G2/M-Checkpoint initiieren und wieder aufheben. Dennoch sollte ihr Checkpoint-Verhalten mit dem einer normalen, hTert-immortalisierten Fibroblasten-Zelllinie verglichen werden. Das Experiment wurde analog zu Abb. 22, für 0 und 2 Gy Bestrahlung durchgeführt (Abb. 24). Die ermittelten MIs der 82-6 hTert Zellen zeigen einen mit

U-2 OS vergleichbaren Verlauf. Nach 2 Gy sinkt der MI etwas stärker ab als in U-2 OS-Zellen und der G2-Arrest wird ca. 1 h länger aufrechterhalten.

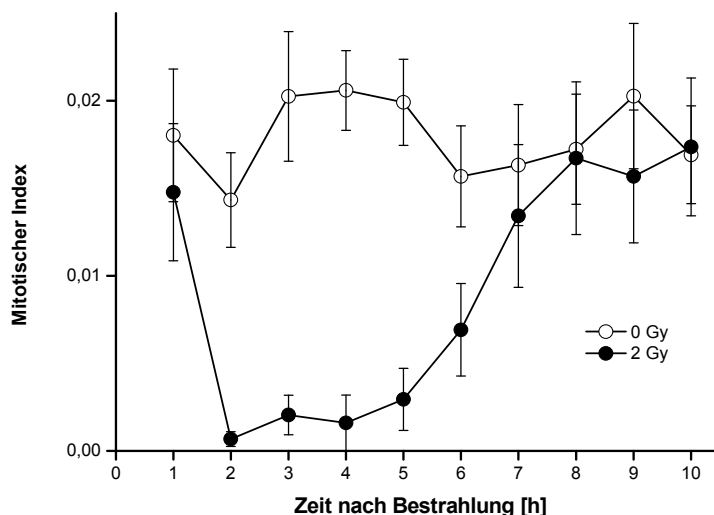


Abb. 24: Mitotischer Index in 82-6 hTert Zellen. Die Zellen wurden 48h vor Versuchsbeginn ausgesät. Nach 2 Gy bzw. simulierter Bestrahlung wurden die Zellen mit einem 10x Objektiv aufgenommen. Die Aufnahmen wurden zu Filmen zusammengestellt und die Zellen als auch die Mitosen pro Position gezählt. Fehlerbalken sind die Standardfehler über die durchgeführten Versuche.

Da die Messung des MI in der Lebendzellmikroskopie neu etabliert wurde, ist auch der Vergleich mit Checkpoint-Messungen mit einer klassischen Methode wie der Durchflusszytometrie (FACS) sinnvoll. Dazu wurden U-2 OS-Zellen mit 1, 2 und 5 Gy bestrahlt und nach verschiedenen Reparaturzeiten fixiert. Mitotische Zellen wurden anhand eines phospho-spezifischen Antikörpers gefärbt, der an Serin 10 phosphoryliertes H3 erkennt. Phospho H3-positive Zellen wurden im Anschluss im FACS quantifiziert. Abb. 25 zeigt den Anteil mitotischer Zellen an der Gesamtpopulation zu verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung. Der MI unbehandelter Zellen ist im FACS geringfügig niedriger als im LCI. Im FACS sinkt der MI nach allen 3 Dosen innerhalb der ersten Stunde ab und ist nach 2 Stunden unter 20% der Kontrolle. Die Zeit der Checkpoint-Aufhebung korreliert mit der Dosis. Es werden relativ exakt die in der Lebendzellmikroskopie gefundenen Zeiten für die Aufhebung des Checkpoints gemessen (Abb. 22 und Abb. 25). Ein methodischer Unterschied zwischen FACS und Lebendzellmikroskopie ist erkennbar. Der MI in der Lebendzellmikroskopie fällt, zumindest nach 1 Gy, lediglich auf 30-40% ab (Abb. 22), während der MI im FACS nach 1 Gy deutlich stärker absinkt. Der Unterschied ist durch die Methoden zu begründen. 2 h nach Bestrahlung misst man mit dem FACS einen Anteil mitotischer Zellen von unter 20%. Dies ist der niedrigste Wert in der Kinetik. In der Lebendzellmikroskopie wird dieser Punkt nicht gemessen. Für den gleichen Zeitpunkt 2 h nach Bestrahlung wird die Summe der Mitosen in der 2. Stunde nach Bestrahlung eingetragen. Die Integration über eine Stunde ist niemals so niedrig wie die Auswertung der Momentaufnahme 2h nach Bestrahlung. Aufgrund der hohen Sensitivität ist die Lebendzellmikroskopie ähnlich der FACS-Messung geeignet, um die Initiierung und die Aufhebung des G2/M-Checkpoints zu messen.

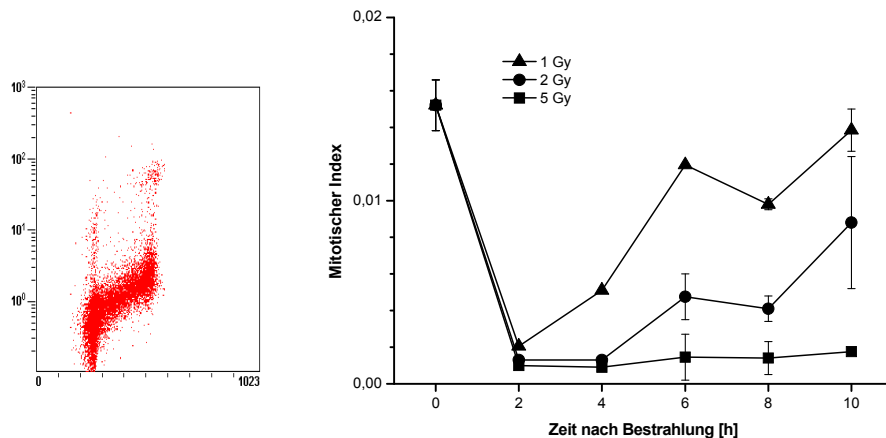


Abb. 25: Mitotischer Index in U-2 OS WT Zellen. 48 h nach Aussaat wurden exponentiell wachsende Zellen mit 0, 1, 2 und 5 Gy bestrahlt und nach verschiedenen Zeiten geerntet. Links: Mitotische Zellen wurden spezifisch mit einem Phospho-H3-Antikörper gefärbt und im FACS identifiziert. Rechts: Der MI wurde gegen die Zeit aufgetragen. Der MI ist hier definiert als Anteil der Phospho-H3 positiven Zellen. Die Fehlerbalken sind die Standardfehler über die durchgeführten Versuche.

4.2.2 Untersuchung der DSB-Reparatur anhand von GFP-53BP1-Foci

Um das Zusammenspiel von Zellzyklusverhalten und DSB-Reparatur am G2/M-Übergang zu charakterisieren, wurde ein in der Lebendzellmikroskopie einsetzbarer DSB-Marker benötigt. Dazu wurde ein stabil transfiziertes GFP-53BP1-Konstrukt verwendet, um die in der lebenden Zelle vorhandenen DSBs sichtbar zu machen. Die vorherigen Experimente hatten gezeigt, dass nach 1 und 2 Gy die Aufhebung des G2/M-Checkpoints gut messbar ist (Abb. 22), so dass diese Dosen auch zur Messung der Reparatur verwendet wurden. 48 h nach der Aussaat von U-2 OS GFP-53BP1-Zellen wurde die Bildaufnahme in der Lebendzellmikroskopie gestartet. Dabei wurde ein 40x Objektiv, 6-25% Lampenintensität und 80-160 ms Belichtungszeiten verwendet, um alle 30 min die gleichen Positionen im GFP-Kanal aufzunehmen. Nach 3 h Vorlauf wurden die Zellen bestrahlt und im Anschluss die Aufnahme der identischen Positionen für >12 h fortgesetzt. Nach Abschluss der Aufnahme wurden die entstandenen Bilder zu Filmen zusammengesetzt. Durch die Filme kommt der Vorteil der Lebendzellmikroskopie gegenüber Methoden mit fixierten Zellen zum Tragen. Durch die Beobachtung der Mitose kennt man die Zellzyklusphasen in der die Zelle bestrahlt wurde und in der die Reparatur stattfand, während man anhand fixierter Zellen nur eine Momentaufnahme dieses Verlaufs erhält (Abb. 26 und vollständiger Film im Anhang 7.4.3). Um DSB-Reparatur in G2 zu untersuchen, wurden GFP-53BP1-Foci in jedem Bild quantifiziert, bis die Zelle in die Mitose eintrat. Zur Reparaturmessung in G1 wurden die Foci-Bilder nach einer Mitose ausgewertet. Das Ziel war es, das Zusammenspiel Reparatur und G2/M-Checkpoint-Regulation zu charakterisieren. Folglich wurden nur Zellen ausgewertet, deren Teilung im Laufe des Versuchs beobachtet wurde. Auf diese Weise wurden Reparaturkinetiken von S/G2- bzw. G1-bestrahlten Zellen erstellt (Abb. 27).

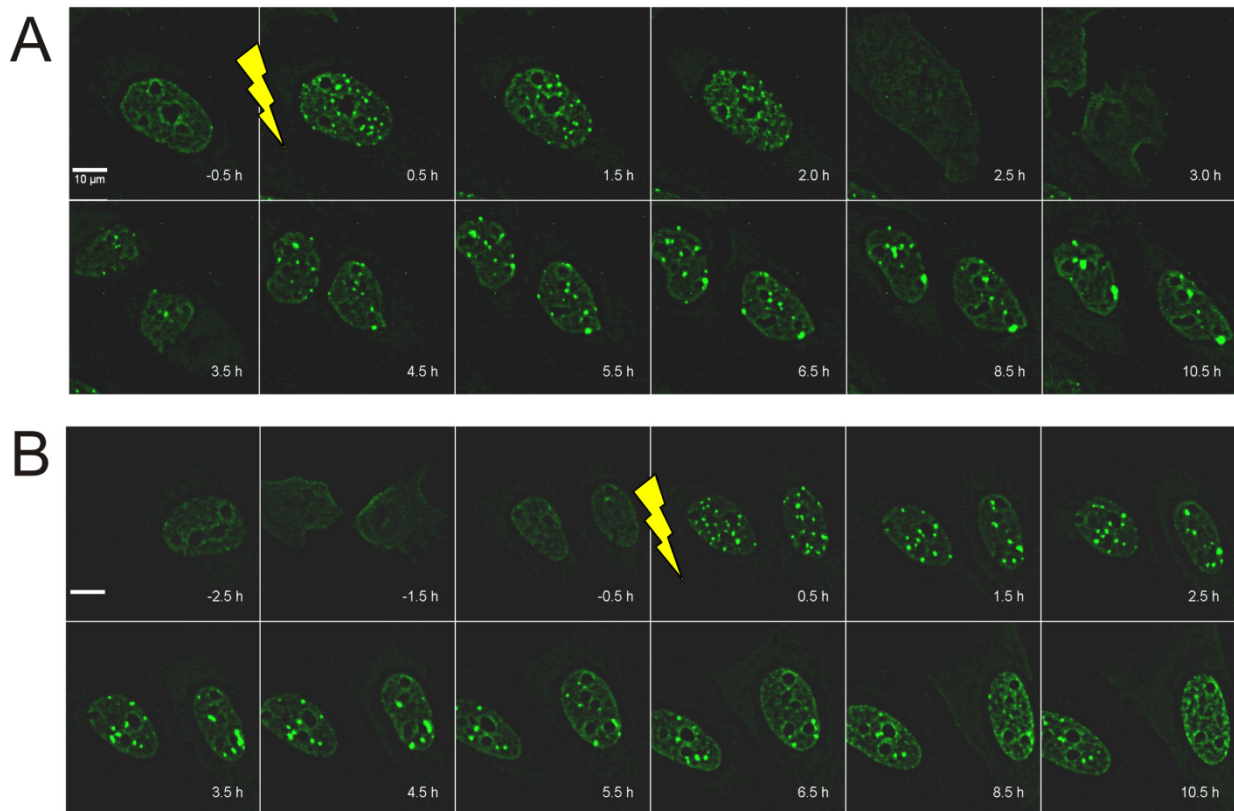


Abb. 26: Zyklische Aufnahme mit 1 Gy bestrahlter U-2 OS-GFP-53BP1-Zellen in der Lebendzellmikroskopie. (A) Nach Bestrahlung in G2 (gelber Blitz) erscheinen GFP-53BP1-Foci. 2 h nach Bestrahlung beginnt die Zelle sich zu teilen, woraufhin das Foci-Signal verschwindet. In G1 erscheinen die Foci wieder und werden aufgrund der Reparatur mit der Zeit weniger. (B) Eine Zelle teilt sich während des Vorlaufs und wird in G1 bestrahlt (1 Gy). Über mehrere h werden die DSBs in G1 repariert. Es wurden zwei Bilder pro Stunde mit einem 40x Objektiv aufgenommen, dekonvolviert und eingefärbt. Für die Montagen wurden die Bilder der wichtigen Stadien übernommen. Die eingefügten Zeitangaben sind relativ zum Bestrahlungs-Zeitpunkt.

In der ersten Stunde nach Bestrahlung sind die induzierten Foci in G2 und G1 zu sehen. Während der Wert für die G2-Zellen bei 20 Foci liegt, kommen die G1-Zellen auf 10 induzierte Foci. Der um den Faktor 2 höhere Wert für G2-Zellen ist auf den höheren DNA-Gehalt zurückzuführen. Die Reparaturkinetiken zeigen den typischen, zweiphasigen Verlauf, in dem 60-70% der DSBs während der ersten 4 h repariert werden (schnelle Komponente) und die restlichen DSBs langsamer repariert werden (langsame Komponente). Da in diesen Lebendzellmikroskopie-Experimenten lediglich die Mitose als Zellzyklusmarker zur Verfügung stand, war die Diskriminierung der S-Phase schwer. Deshalb sind evtl. die frühen Zeitpunkte der G2- und die späten Zeitpunkte der G1-Kinetik durch S-Phase-Zellen beeinflusst, die spontan mehr Foci enthalten und somit den dort gemessenen Wert erhöhen.

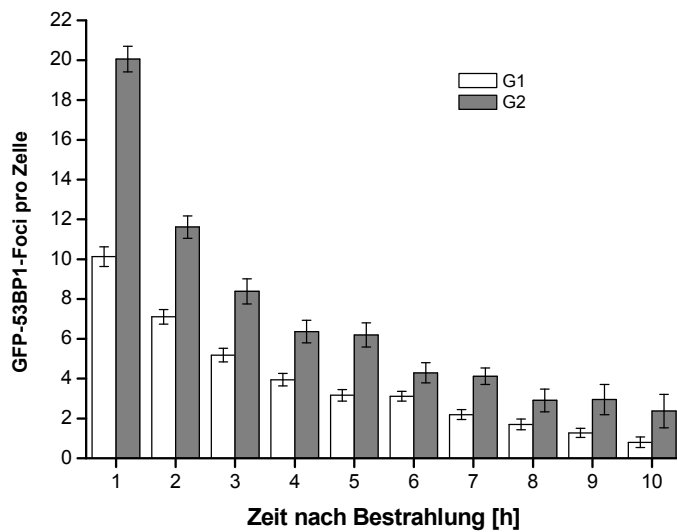


Abb. 27: DSB-Reparatur nach 1 Gy in U-2 OS GFP-53BP1-Zellen. 48 h nach Aussaat wurde mit den Aufnahmen begonnen. Im Vorlauf wurden die Zellen mit einem 40x Objektiv im Durchlicht aufgenommen. Nach 2 h wurden die Zellen bestrahlt. Im Anschluss wurden die Aufnahmen im Durchlicht- und im Fluoreszenz-Modus fortgesetzt. Die Aufnahmen wurden zu Filmen sortiert und die Foci der Zellen im Film gezählt. Die Auswertung wurde getrennt für G2- Zellen (bis zur Mitose) und G1-Zellen (Bestrahlung nach der Mitose) durchgeführt. Die in Abb. 18 aufgeführten spontanen Foci wurden abgezogen. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler über die im Schnitt 100 pro Zeitpunkt ausgewerteten Zellen dar.

Die für G1 und G2 ermittelten Reparaturkinetiken zeigen eine geringere Foci-Zahl als fixierte Zellen nach der gleichen Bestrahlung (Abb. 16). Der Verlauf der Reparaturkinetik und die Reparaturgeschwindigkeit sind jedoch vergleichbar mit der in fixierten Zellen gemessenen Reparatur, sodass die Lebendzellmikroskopie gut zur Messung von Reparaturkinetiken eingesetzt werden kann.

4.2.3 Zusammenspiel von DSB-Reparatur und Zellzyklus-Verhalten am G2/M-Übergang

Für Abb. 27 wurde der Zeitpunkt der Mitose genutzt, um die Zellen und die stattfindende Reparatur einer Zellzyklusphase zuzuordnen. Die Reparatur aller G2-bestrahlten Zellen wurde für die G2-Kinetik ausgewertet. Sobald die einzelne Zelle sich teilte, wurde sie aus der G2-Auswertung ausgeschlossen. Analog wurden für die G1-Kinetik nur Zellen verwendet, die in G1 bestrahlt wurden. Diese Auswertung ließ keine Aussage über das Verhalten oder die Reparatur einzelner Zellen zu. Um das Verhalten der G2-bestrahlten Zellen genauer zu charakterisieren, wurden die Zellen nach dem Zeitpunkt ihrer Mitose gruppiert und die Reparatur innerhalb solcher Gruppen ausgewertet. Es wurde also die Reparatur einer Gruppe von Zellen charakterisiert, die das gleiche Zellzyklusverhalten zeigten. Im gleichen Schritt wurden G2-bestrahlte Zellen über die Mitose hinweg verfolgt, und ihre Reparatur in G1 gemessen. Auf gleiche Weise wurden in G1 bestrahlte Zellen gruppiert und ihre Reparatur in G1 gemessen.

Die Prophase liegt nah am G2/M-Checkpoint und ist somit ein direkter Marker für das Aufheben des Checkpoints. Daher wurde in diesen Experimenten die frühe Prophase gewertet, d.h. die beginnende Kondensierung des Chromatins, die im 40x Objektiv gut zu erkennen ist (Abb. 28).

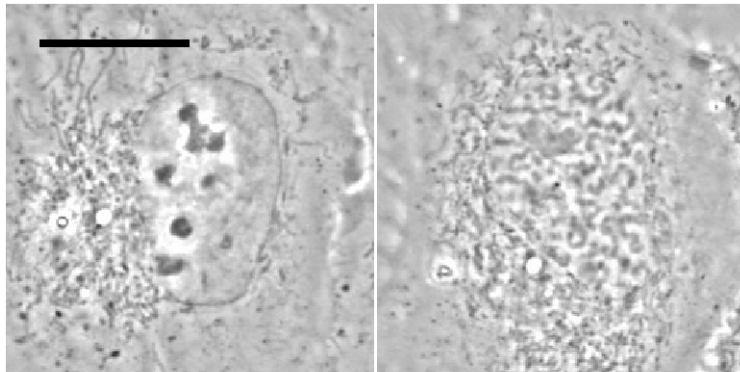


Abb. 28: Der Zellkern im Durchlicht. Mit Eintritt in die Mitose verändert der Zellkern seine Morphologie. In G2 sind die Kernhülle und die Nukleolie kontrastreich zu sehen. Ausserhalb des Kerns sind Strukturen im Zytoplasma erkennbar. Im rechten Bild befindet sich die Zelle in der Prophase. Die Nukleoli verblassen, und das Chromatin beginnt zu kondensieren. Der Maßstabsbalken beträgt 10 μm .

Zusätzlich zur Bestrahlung mit 1 Gy (Abb. 29) wurden auch Zellen nach 2 Gy ausgewertet (Abb. 30), wodurch jeweils große Sätze einzelner Kinetiken entstanden. Da der MI durch die Bestrahlung und die resultierende Induktion des G2/M-Checkpoints zunächst stark abnimmt, repräsentieren manche Gruppen nur einzelne Zellen, so dass die resultierenden Foci-Werte nicht hinreichend belegt sind. Die nur aus wenigen Zellen bestehenden Kinetiken wurden hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt. Vollständige Abbildungen sind als Anhang in den Abschnitten 7.2 und 7.3 zu finden.

Die unterschiedliche Zahl induzierter Foci zu Beginn der Kinetik spiegelt den unterschiedlichen DNA-Gehalt der Zellzyklusphasen wider. Zellen, deren Mitose im Vorlauf beobachtet wurde (negative Zeitangabe) befinden sich in G1, während die Mitose der G2-Zellen noch bevorsteht (positive Zeitangabe). Die G1-bestrahlten Populationen (grün) zeichnen sich neben der geringeren Induktion von DSBs durch eine konstante Reparatur aus. Nach 1 Gy weisen sie ca. 11 Foci auf, die nach 7-8 h bis zu einem Level ~ 2 Foci repariert werden. Nach 2 Gy werden etwas mehr als die doppelte Anzahl von Foci induziert, die nach 10 h aber auf einen vergleichbaren Level reparieren. Die Kinetiken der G1 bestrahlten Populationen sind die einzigen, in denen keine Lücken vorkommen. In allen anderen Populationen liegt die Mitose innerhalb der Phase der Foci-Beobachtung, und da während der Mitose keine 53BP1-Foci sichtbar sind (siehe Abb. 26), entstehen hier Lücken in den Kinetiken. Die ersten Foci-Daten der Zellen, die während oder direkt nach der Bestrahlung durch die Zellteilung gehen (rot), entstammen der frühen G1-Phase. Hier ist ein leicht ansteigender Schadenslevel zu beobachten, da die Foci-Qualität und damit ihre Detektierbarkeit zunächst besser wird. Ansonsten sind die während der Mitose bestrahlten Zellen nach 1 Gy, vor allem aber nach 2 Gy die am schlechtesten reparierenden Zellen. Nach 1 Gy verbleiben nach 10 h ca. 3, nach 2 Gy ca. 5 Foci, und dieser Schadenslevel verringert sich auch nicht mehr signifikant.

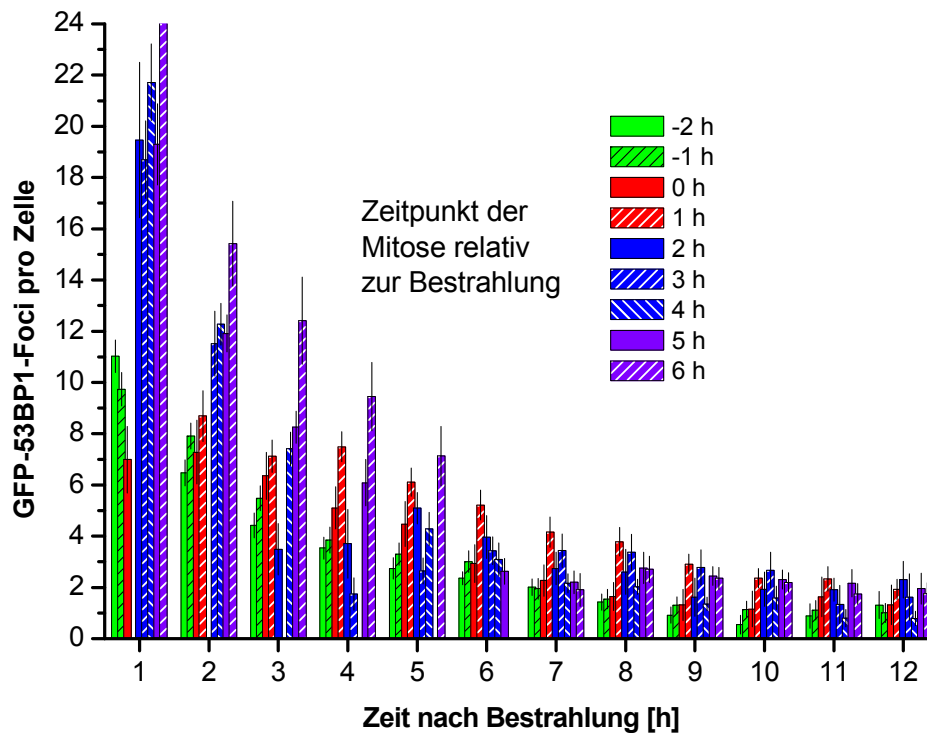


Abb. 29: Reparatur von DSBs in U-2 OS GFP-53BP1 Zellen. 48h nach Aussaat wurde begonnen die Zellen mit einem 40x Objektiv im Durchlicht aufzunehmen. Nach 2h wurden die Zellen entnommen und mit 1 Gy bestrahlt, um sie im Anschluss weiter, nun auch im Fluoreszenzmodus die Foci, aufzunehmen. Die Aufnahmen wurden zu Filmen sortiert und die Foci der Zellen im Film gezählt. Ausgewählte Datensätze von in G2 oder früh G1 bestrahlten Zellen. Grün sind in G1 bestrahlte Zellen, rot sind in der Mitose, bzw. nach dem G2/M-Checkpoint bestrahlte Zellen, Blau sind G2-Zellen die den Checkpoint nach Reparatur aufheben und in die Zellteilung gehen. Der in Abb. 18 beschriebene Hintergrund wurde abgezogen. Die Fehlerbalken sind die Standardfehler über die ausgewerteten Zellen.

In den Populationen, die sich 2-6 h nach Bestrahlung teilen (blau), sind Zellen enthalten die einen G2/M-Checkpoint induziert haben. Von diesen Zellen gehen einzelne sehr früh (nach 2 h) mit vielen Foci in die Zellteilung, und andere heben zusammen mit der Mehrzahl der Zellen den Checkpoint auf (4-6 h). Zellen, welche in G2 bestrahlt wurden (blau), zeigen Reparatur in G2, bevor die Lücke der Mitose auftritt. Der letzte Wert vor der Mitose ist in vielen Gruppen auffallend niedrig. Die genaue Ursache für diesen Abfall ist nicht eindeutig. Zum einen findet in diesem Zeitraum weitere Reparatur statt, zum anderen wird das GFP-53BP1-Signal in dieser Phase vor der Mitose sprunghaft schlechter. Nach der Mitose haben die Zellen ihren DNA-Gehalt halbiert, so dass auch die DSB-Zahl pro Zelle halbiert werden sollte. Tatsächlich haben die Zellen direkt nach der Mitose sehr wenige Foci (in manchen Gruppen < 2). Die Anzahl der Foci nimmt jedoch aufgrund der sich verbessernden Signalqualität zunächst zu, um sich nach ca. 8 h bei 3 Foci (1 Gy) bzw. bei 5 Foci (2 Gy) einzupendeln. Eine deutliche Reparatur bleibt überraschenderweise im Beobachtungszeitraum aus, und die Foci-Zahlen bleiben, im Vergleich zu in G1 bestrahlten Zellen deutlich erhöht. Nach beiden Dosen gibt es eine Population, die über den gesamten Beobachtungszeitraum eine

bessere Reparatur als die übrigen Populationen aufweist. Dabei handelt es sich um die Populationen, die sich 4 h nach 1 Gy und 5 h nach 2 Gy Bestrahlung teilen. Vergleicht man diese Zeitpunkte mit dem Checkpointverhalten der Zellen (Abb. 22), so wird deutlich, dass dies die Populationen mit dem zahlenmäßig größten Volumen sind. Berücksichtigt man nun die unterschiedliche Detektion der Mitose in den beiden Auswertungen (frühe Prophase für die Foci und Zytokinese für den MI), so ist der Zeitpunkt der G2/M-Checkpoint-Aufhebung aufgrund der MI-Daten bei 4 h, bzw. 5 h nach 1 und 2 Gy zu vermuten. D.h. diese Zellen treten zu einem Zeitpunkt in die Mitose ein, zu dem in der Mehrheit der Zellen der G2/M-Checkpoint aufgehoben wird.

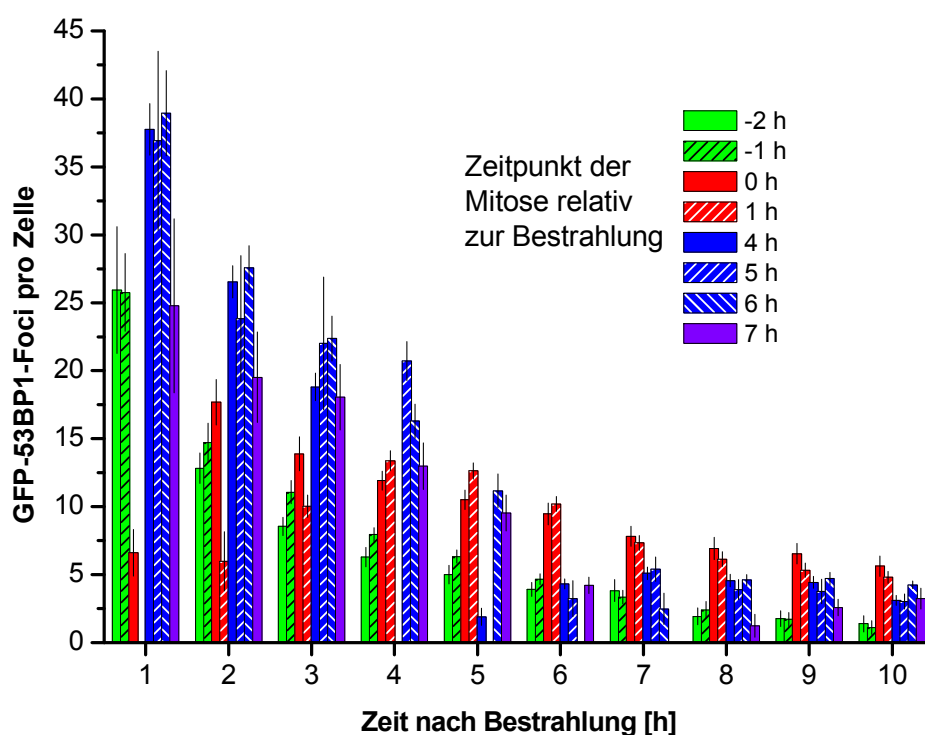


Abb. 30: Reparatur von DSBs in U-2 OS GFP-53BP1 Zellen. 48h nach Aussaat wurde begonnen die Zellen mit einem 40x Objektiv im Durchlicht aufzunehmen. Nach 2h wurden die Zellen entnommen und mit 2 Gy bestrahlt, um sie im Anschluss weiter, nun auch im Fluoreszenzmodus die Foci, aufzunehmen. Die Aufnahmen wurden zu Filmen sortiert und die Foci der Zellen im Film gezählt. Ausgewählte Datensätze von in G2 oder früh G1 bestrahlten Zellen. Die Farben der Datensätze wurden analog zu Abb. 29 gewählt. Der in Abb. 18 beschriebene Hintergrund wurde abgezogen. Die Fehlerbalken sind die Standardfehler über die ausgewerteten Zellen.

10 h nach 1 Gy weisen Zellen, die in G2 bestrahlt wurden und sich nach der Bestrahlung geteilt haben (blau), in G1 weniger Foci auf, je mehr Zeit sie vor der Mitose zum Reparieren hatten. Die Populationen die sich 5 h nach 1 Gy bzw. 7 h nach 2 Gy teilen (violett) durchbrechen diesen Trend. Es handelt sich dabei um Zellen, die zu einem Zeitpunkt, nachdem die Mehrzahl der Zellen sich bereits geteilt hat, in die Mitose geht. Bei ihnen mag der Schaden oder die Reparatur anders sein, evtl. enthalten sie auch viele in der S-

Phase bestrahlte Zellen. Die Reparaturgeschwindigkeit von DSBs unterscheidet sich stark, je nachdem in welcher Zellzyklusphase sich die Zelle aufhält. Besonders auffällig ist die schlechte Reparatur in G1-Zellen, deren DSBs in G2 induziert wurden und die sich danach teilten. Das Durchlaufen der Mitose scheint die DSBs in einer Weise zu verändern, die eine Reparatur in G1 erschwert. Somit stellte sich die Frage nach der Ursache dieser schlechten Reparatur. Eine einfache Erklärung wäre eine in G2 erfolgte Resektion, die später in G1 nicht über NHEJ repariert werden kann. Möglich wäre auch eine Störung in der Chromatinstruktur durch einen fehlerreparierter Bruch oder einen nicht abgeschlossenen Reparaturvorgang. Dies könnte in der Mitose zu Problemen führen und die zu reparierende Struktur würde weiter verkompliziert. Die Ursache für die schlechte Reparatur in G1 wurde im weiteren Verlauf untersucht.

4.3 Charakterisierung der von G2 in die Mitose gelangenden Schäden

4.3.1 Anaphase-Brücken nach Bestrahlung in G2

In den vorherigen Experimenten wurde gezeigt, dass Zellen nach Bestrahlung in G2 den Checkpoint aufheben und sich teilen. Die anschließende Reparatur in G1 war auffallend langsam. Es wurde vermutet, dass Vorgänge in der Mitose die DSB-Strukturen verändert haben und somit die Reparatur erschweren. Verschiedene Strukturen wie dizentrische Chromosomen, unreparierte Schäden oder in der Reparatur befindliche DSBs könnten in der Anaphase einer Zugbelastung ausgesetzt sein, die zu Schäden an der Chromatinstruktur führt. Um einen direkten Zusammenhang zwischen Bestrahlung in der G2-Phase und in der Mitose auftretende Komplikationen herzustellen, wurde die Induktion von Anaphase-Brücken nach Bestrahlung in G2 untersucht. Anaphase-Brücken sind DNA-haltige Verbindungen zwischen Schwesterchromatiden in der Anaphase, deren Entstehung vor allem auf Stress während der Replikation zurückgeführt wird (Chan et al. 2007, Chan et al. 2009). Sog. *entanglements*, in denen ein Einzelstrang der DNA durch den DNA-Doppelstrang der Schwesterchromatide durchgeführt wird, entstehen während der Replikation aus nicht aufgelösten *double-holliday-junction*. In Tumorzellen ist die Häufigkeit von Anaphase-Brücken erhöht, was dem stärkeren Replikationsstress in den schnell proliferierenden Zellen zugeschrieben wird. Die *entanglements* werden in G2 nicht als Schaden erkannt, müssen aber in der Metaphase, spätestens in der Anaphase erkannt und aufgelöst werden, um die Auftrennung der Chromatiden auf die zukünftigen Tochterzellen nicht zu behindern und als Anaphase-Brücken in Erscheinung zu treten (Wang L. H. et al. 2008). Darüber hinaus ist bekannt, dass Anaphase-Brücken aus dizentrischen Chromosomen entstehen, die wiederum ihre Ursache in fehlerhaftem NHEJ haben

(Gisselsson et al. 2000). Untersucht werden sollte, ob Anaphase-Brücken auch aus DSBs in G2 entstehen können.

Um die Ausbildung von Anaphase-Brücken nach Bestrahlung in G2 zu messen, wurden U-2 OS WT-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und 48 h später mit 1 Gy bestrahlt. Um Effekte von in der S-Phase bestrahlten Zellen auszuschließen, wurden die Zellen direkt nach Bestrahlung mit Aphidicolin behandelt. Zu Zeitpunkten, zu denen die Zellen wieder mit der Zellteilung beginnen, wurden die Zellen fixiert und die DNA angefärbt. Anschließend wurden die Deckgläschen nach Anaphasen abgesucht und die Zahl der

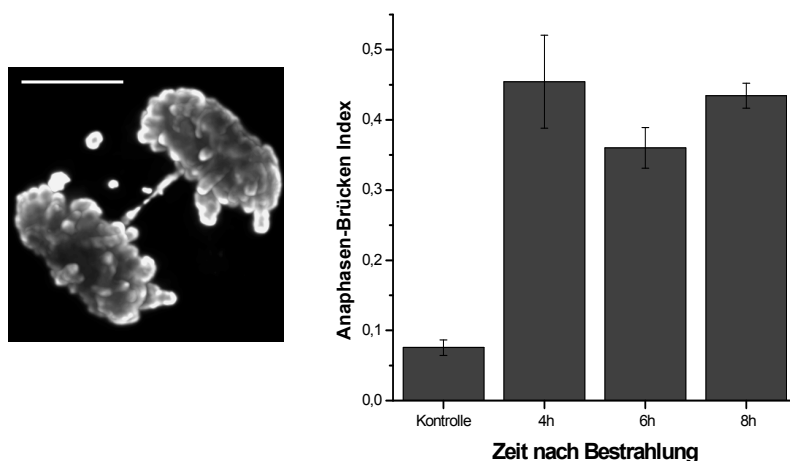


Abb. 31: Links: Färbung einer Anaphase-Brücke mit einem Antikörper gegen phospho-H3. Der Größenstandard beträgt 10 µm. Rechts: Induktion von Anaphasen-Brücken durch Bestrahlung in G2. Die Zellen wurden 48h vor Versuchsbeginn auf Deckgläschen ausgesät. Mit Ausnahme der Kontrolle wurden die Zellen mit 1 Gy bestrahlt und nach 4, 6 und 8h fixiert. Über eine immunfluoreszente Färbung der mitosespezifischen Phosphorylierung des Histons 3 wurden die Mitosen im Scanning-Mikroskop identifiziert und dann manuell auf Anaphasen und enthaltene Anaphase-Brücken untersucht. Der Anaphase-Brücken Index ist der Quotient aus gefundenen Brücken und Anzahl der Anaphasen. Die Fehlerbalken sind die Standardfehler über die durchgeführten Versuche.

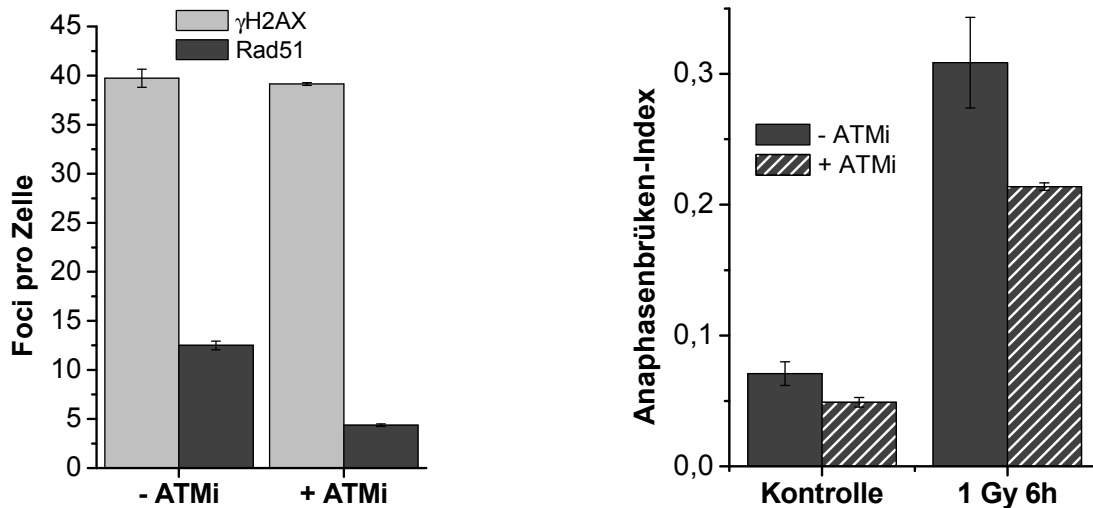
Brücken pro Anaphase (Anaphasen-Brücken-Index, ABI) bestimmt (Abb. 31).

Zu allen drei Zeiten nach Bestrahlung in G2 ist ein starker Anstieg des ABI zu sehen. Während ohne Bestrahlung nur jede 10. Anaphase eine Brücke enthält, ist es 4 h nach 1 Gy fast jede 2. Anaphase. Der ABI bleibt auch 6 und 8 h nach Bestrahlung erhöht, bis die Mehrheit der Zellen die G2-Phase verlassen hat. Es konnte somit gezeigt werden, dass eine Bestrahlung in G2 zur Induktion von Anaphase-Brücken führt.

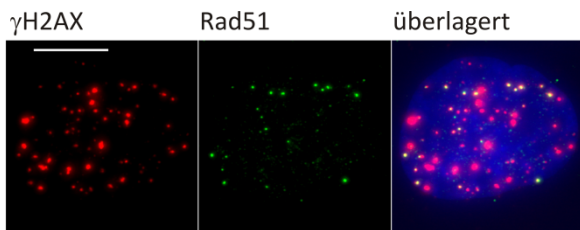
Im nächsten Schritt sollte getestet werden, ob diese Erhöhung des ABI nach Bestrahlung in G2 auf die Reparatur von DSBs über HR zurückzuführen ist. Dazu wurde die Initiierung der HR durch die Kinase ATM inhibiert. Die initiale Resektion HR-reparierter DSBs findet nach einer ATM-abhängigen Phosphorylierung von CtIP statt. Durch Inhibition von ATM wird daher die Zahl über HR reparierter DSBs reduziert. Zur Kontrolle der Funktion des ATM-Inhibitors (ATMi) wurde 30 min vor Bestrahlung ATMi auf wachsende U-2 OS-Zellen gegeben oder unbehandelt belassen. Nach der Bestrahlung mit 1 Gy wurden die Zellen mit Aphidicolin versetzt. 2 h später wurden die Zellen fixiert und RAD51 sowie γ H2AX für die

Fluoreszenzmikroskopie gefärbt. Die G2-Zellen wurden wie in Abschnitt 3.4.4 beschrieben identifiziert und RAD51- sowie γ H2AX-Foci quantifiziert (Abb. 32 links).

Ohne ATMi werden ca. 13 RAD51-Foci pro G2-Zelle induziert und annähernd 40 γ H2AX-Foci. Nach ATMi-Zugabe verringert sich die Anzahl von RAD51-Foci auf ca. 4 pro Zelle. Die beabsichtigte Reduktion der HR konnte also durch die ATMi-Behandlung erreicht werden.



Ohne ATMi



Mit ATMi

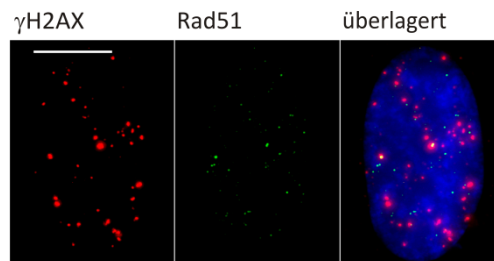


Abb. 32: Reduktion von Anaphasen-Brücken durch Inhibition von ATM in G2. Die Zellen wurden 48 h vor Versuchsbeginn auf Deckgläschen ausgesät. Mit Ausnahme der Kontrolle wurden die Zellen mit 1 Gy bestrahlt und mit Aphidicolin versetzt um sie nach 2 und 6 h zu fixieren. Oben links: Über eine fluoreszente Färbung von RAD51-Foci in G2-Zellen wurde die Reduzierung der Resektion nach 1 Gy und 2 h überprüft. Oben rechts: Über die intensive DAPI-Färbung wurden die Anaphasen im Scanning-Mikroskop identifiziert und dann manuell auf Anaphase-Brücken untersucht. Unbestrahlte Kontrollen wurden mit Zellen verglichen, die mit 1 Gy bestrahlt und 6 h später, nach Aufhebung des G2/M-Checkpoints ausgewertet wurden. Die Fehlerbalken sind die Standardfehler über die durchgeführten Versuche. Unten: U-2 OS Zellen in G2 nach 1 Gy und 2 h Reparatur. Nach ATMi-Behandlung ist die in G2 induzierte Zahl an RAD51-Foci reduziert. Der Größenstandard beträgt 10 μ m.

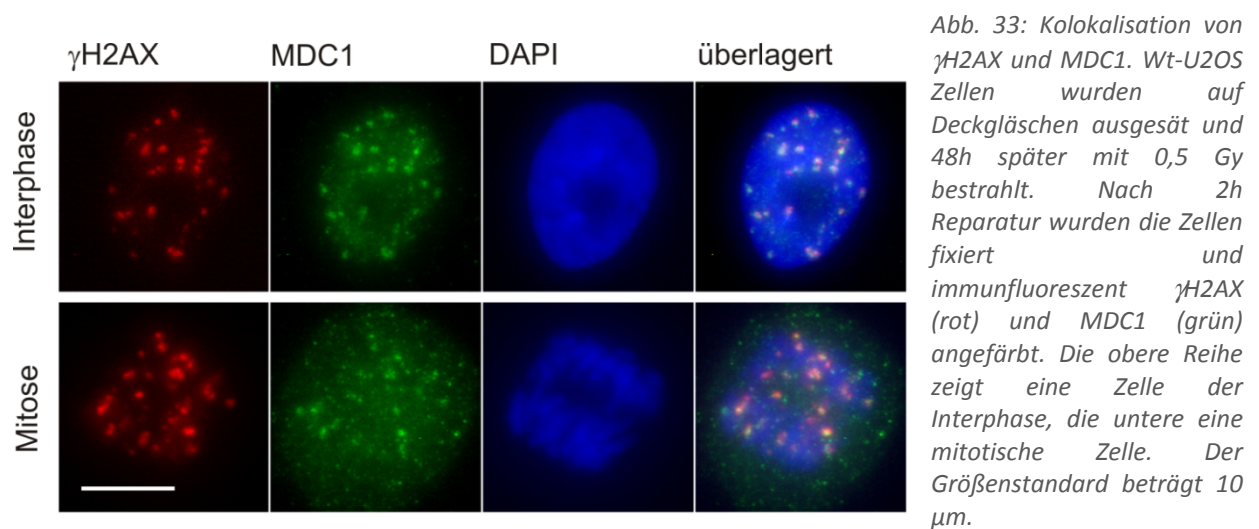
Zur Evaluation der Anaphase-Brücken wurden die Zellen mit ATMi versetzt oder unbehandelt gelassen, sodann mit 1 Gy bestrahlt und mit Aphidicolin versetzt. 6 h später wurden die Zellen fixiert und die DNA mit DAPI anfärbt. Die Zellen wurden eingescannt, um die Anaphasen zu identifizieren, und auf Anaphase-Brücken zu untersuchen. Durch die Bestrahlung der unbehandelten Zellen in G2 ist ein Anstieg des ABI von 0,07 auf 0,3 zu beobachten (Abb. 32 rechts). Nach ATMi-Zugabe verringert sich der ABI

unbestrahlter Zellen um ca. ¼. Ein größerer Effekt konnte in bestrahlten Zellen erzielt werden. ATM-Inhibition, und somit Unterdrückung der HR konnten die Zahl der Anaphase-Brücken 6 h nach Bestrahlung um ca. 1/3 reduzieren.

Die Experimente haben gezeigt, dass Bestrahlung in G2 Anaphase-Brücken verursacht. Es ist bekannt, dass zu Zeiten zu denen der G2/M-Checkpoint aufgehoben wird, annähernd 50% der Brüche in G2 resektiert sind und über HR repariert werden (Beucher et al. 2009). ATMi reduziert in G2 die Zahl der über HR reparierten Brüche, was an einer geringeren Zahl RAD51-Foci ablesbar ist. Diese Reduktion der HR-Ereignisse führt zu einer geringeren Induktion von Anaphase-Brücken, was zeigt, dass ein Teil dieser Anaphase-Brücken aus HR-Ereignissen hervorgeht.

4.4 GFP-MDC1-Foci in der Mitose

Das Durchlaufen der Mitose wurde als Ursache der schlechten Reparatur und persistierender Brüche in G1 angenommen. Anaphase-Brücken wurden als Folge der DSB-Reparatur über HR in G2 beschrieben. Eine Untersuchung der DSB-Reparatur während der Mitose war aber mit dem verwendeten GFP-53BP1-Konstrukt nicht möglich, da 53BP1 während der Mitose nicht am DSB lokalisiert ist. Um dem auszuweichen, wurde ein weiterer DSB-Marker, das GFP-MDC1, in der Lebendzellmikroskopie eingesetzt.



4.4.1 Aufnahmebedingungen mitotischer GFP-MDC1-Foci

MDC1 gehört wie 53BP1 zu den früh an den DSB rekrutierten Mediator-Proteinen. Im Gegensatz zu 53BP1 ist es aber auch während der der Mitose am DSB lokalisiert (Nakamura et al. 2010). Daher sollten zur Untersuchung der Vorgänge in der Mitose stabil mit einem GFP-MDC1-Konstrukt transfizierte U-2 OS-Zellen verwendet werden, die freundlicherweise von Dr. Claudia Lukas zur Verfügung gestellt wurden

(Lukas et al. 2004). In der Immunfluoreszenzmikroskopie konnte die Kollokalisierung von MDC1 und γ H2AX sowohl in der Interphase als auch in der Mitose bestätigt werden (Abb. 33). In den Färbungen für die Immunfluoreszenzmikroskopie als auch in den ersten Aufnahmen der GFP-MDC1-Foci in der Lebendzellmikroskopie wurde jedoch ersichtlich, dass die Qualität der MDC1-Foci schlechter ist als die der bisher ausgewerteten 53BP1- und γ H2AX-Foci (Abb. 33 und Abb. 34). Die Signale sind weniger distinkt, und der Hintergrund im Zellkern ist relativ hoch. Besonders die Aufnahme relativ schwacher mitotischer Foci in der Lebendzellmikroskopie erforderte die Benutzung längerer Belichtungszeiten, den Einsatz höherer Lampenintensitäten und die Verwendung eines lichtstarken 63x Objektivs NA 1,4. Da das 63x Objektiv eine geringere Tiefenschärfe verfügt als das sonst verwendete 40x Objektiv, musste ein kleinerer Abstand zwischen den Z-Ebenen gewählt werden. Aufgrund der abgekugelten Form mitotischer Zellen waren zusätzlich mehr Bild-Ebenen notwendig um, die gesamte Zelle in Z-Richtung zu erfassen, so dass letztendlich 24 Ebenen mit 250 nm Abstand aufgenommen wurden. Um die Auswertung zu erleichtern, wurden anschließend alle GFP-MDC1-Bilder dekonvolviert (Abb. 34). Da die in der Mitose ablaufenden Prozesse sehr schnell sind, mussten in möglichst schneller Folge Bilder einer Zelle aufgezeichnet werden. Mit der zunächst eingestellten Zyklendauer von 5 min war z.B die Trennung der Chromatiden in der Anaphase nicht zu beobachten, da dieser Prozess innerhalb von 2-3 min abgeschlossen ist. Bei den

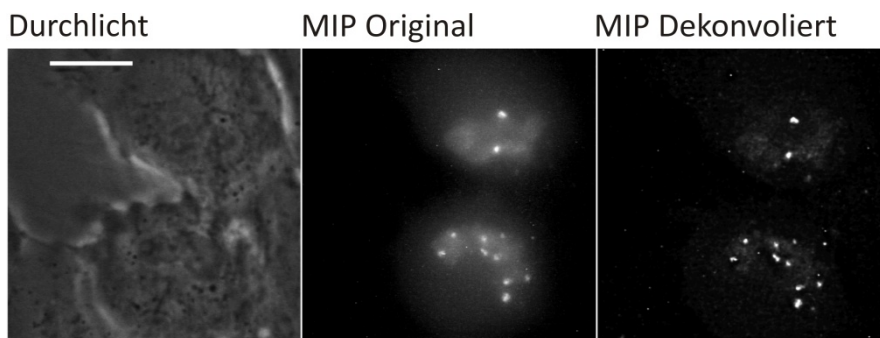


Abb. 34: GFP-MDC1-Foci in der Anaphase einer U-2 OS-Zelle. Gegenübergestellt sind die Darstellung der Zelle im Durchlicht, die Maximum-Intensitäts-Projektion (MIP) des originalen GFP-Bilder-Stapels und der MIP des dekonvolvierten Stapels. Der Maßstabsbalken beträgt 10 μ m.

nötigen Belichtungszeiten von 0,75 sek pro Ebene war es schließlich möglich, 2 Zellen innerhalb einer Minute aufzunehmen. Die hohen Lichtintensitäten, die große Anzahl der Ebenen sowie die häufigen Aufnahmen stellten eine hohe Belastung für die beobachtete Zelle dar. Nach 2 h Beobachtung in der Mitose traten ein deutliches Ausbleichen und in einzelnen Fällen auch Blasenbildung (*blebbing*) auf. Diese Bedingungen waren somit ungeeignet, um eine Zelle über einen noch längeren Zeitraum zu beobachten. Die direkte Auswirkung der Aufnahmebedingungen auf die Zahl der GFP-MDC1-Foci wurde getestet, indem unbehandelte Zellen aufgenommen und die enthaltenen Foci quantifiziert wurden (enthalten in Abb. 37). Dabei konnten in der Tat Veränderungen im Foci-Level beobachtet werden. Durch die Mitosephase-spezifische Auftragung der mittleren Focizahl wird jedoch deutlich, dass die Schwankungen durch das Fortschreiten in der Mitose zustande kommen. Auch in den einzelnen Filmen, die in die

Auswertung eingeflossen sind, trat nie eine ungewöhnliche Foci-Zunahme unabhängig von der Mitosephase auf.

4.4.2 Verfolgung und Quantifizierung von in G2 induzierten mitotischen Foci

Nachdem die Aufnahmebedingungen zur Detektion von GFP-MDC1-Foci in der Mitose optimiert wurden, wurde die Reparatur G2-induzierter DSBs in der Mitose untersucht. Dazu wurden U-2 OS GFP-MDC1 Zellen 48 h nach Aussaat mit 1 Gy bestrahlt. Um gezielt Zellen zu untersuchen, die nach der Bestrahlung den G2/M-Checkpoint induziert und dann wieder aufgehoben haben, wurde mit der Aufnahme zwischen 2-5 h nach Bestrahlung begonnen. Dabei wurden manuell im Durchlicht Prophase-Zellen ausgesucht und mit dem 63x Objektiv aufgenommen (Abb. 35 und Film im Anhang 7.4.4). Nach ca. 1,5 h war die Mitose der beiden beobachteten Zellen abgeschlossen, und es konnten noch weitere 1-2 Filme derselben Bestrahlungsprobe aufgenommen werden. Nach der Aufnahme wurden die Bilder zu Filmen zusammengesetzt und dekonvoliert, um die Foci in jedem Bild zu quantifizieren (Abb. 35). Genau wie die Prophase wurden auch die anderen Mitose-Phasen im Durchlicht erkannt und die Foci-Werte im Verlauf

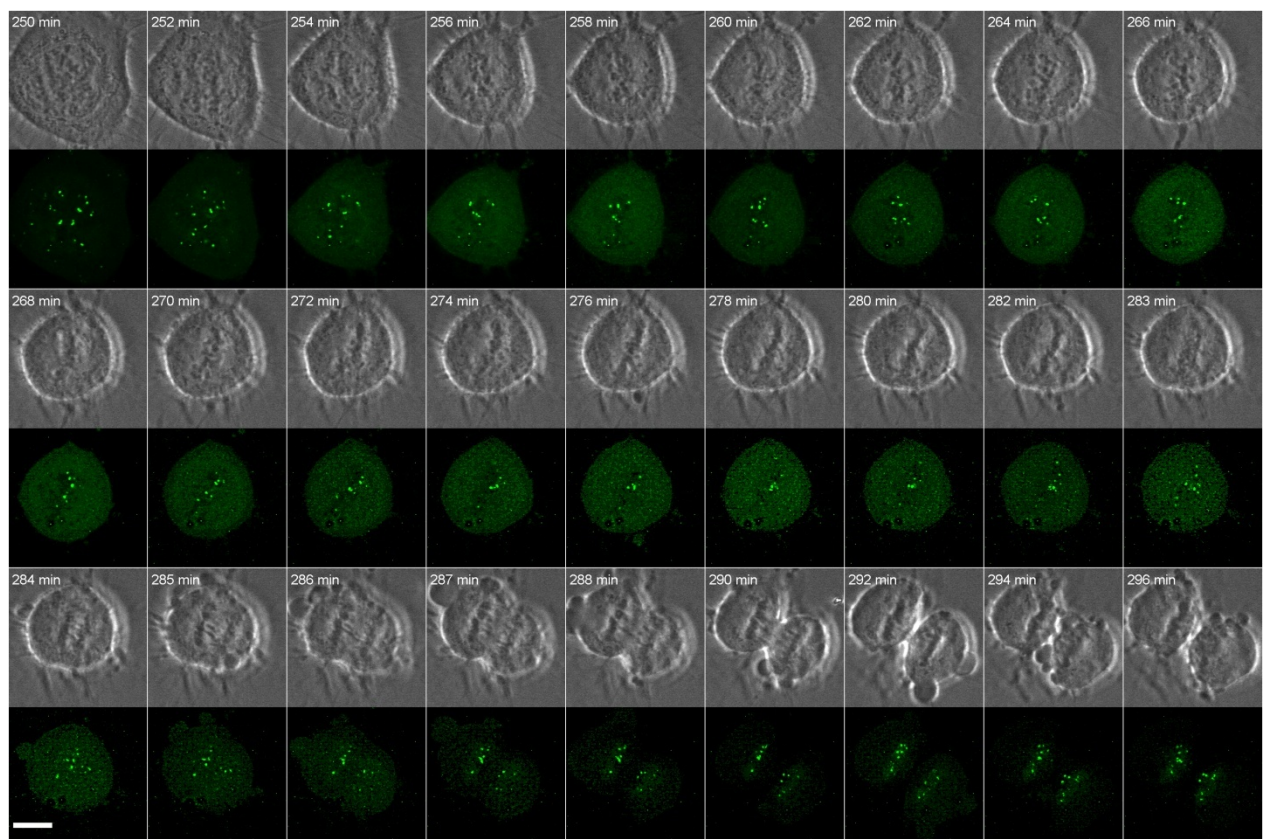


Abb. 35: GFP-MDC1 Foci in der Mitose. U-2 OS GFP-MDC1 Zellen wurden in μ Slides ausgesät und 48 h später mit 1 Gy bestrahlt. Nach mind. 2h Reparatur erfolgten Aufnahmen mit dem 63x Objektiv im Abstand von 1 min. Es werden dekonvolierte Aufnahmen der Zelle von der Prophase bis zur Telophase gezeigt, aus Platzgründen wurden jedoch einzelne Bilder ausgelassen (siehe Zeitstempel). Der Maßstabsbalken beträgt 10 μ m.

der Filme den Mitose-Phasen zugeordnet. Die Dauer der einzelnen mitotischen Phasen ist von Zelle zu Zelle verschiedenen, wodurch sich für eine Zelle, die sich nur kurz in einer bestimmten Phase aufhält eine Lücke in der Darstellung ergäbe. Für eine lückenlose Darstellung des Foci-Levels wurden Zellen mit ungewöhnlich langen Phasen (2 Zellen) aus der Auswertung ausgeschlossen. Bei Zellen mit sehr kurzen Phasen wurden die einzelnen Phasen auf die durchschnittliche Dauer verlängert und die entstehenden Lücken durch Interpolation der Foci-Werte aufgefüllt (Abb. 36). Die individuell sehr unterschiedlichen Foci-

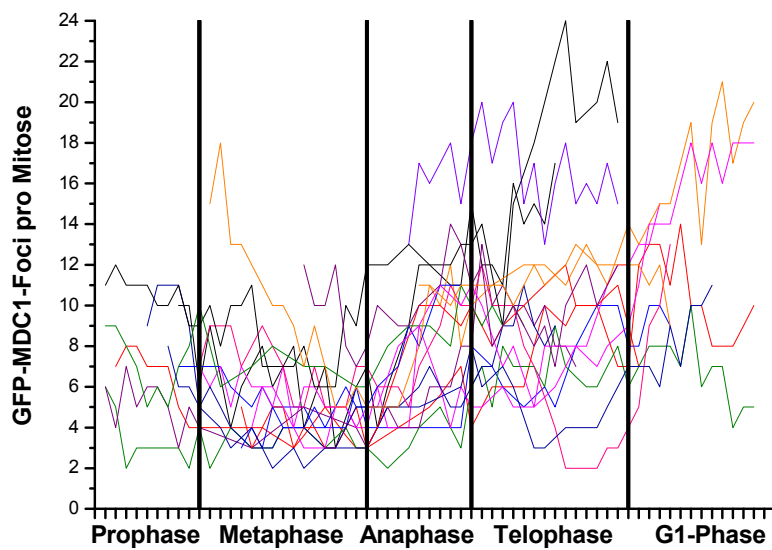


Abb. 36: Quantifizierung von GFP-MDC1 Foci in der Lebendzellmikroskopie. U-2 OS GFP-MDC1 Zellen wurden in μ Slides ausgesät und 48h später wurde die Aufnahme mit 1 Gy bestrahlter Zellen begonnen. 18 Filme wurden dekonvolviert und ausgewertet. Für die Darstellung wurden die individuell unterschiedlich langen Mitosephasen durch Strecken und Interpolation auf gleiche Länge gebracht. Ungewöhnlich lange Mitosephasen wurden ausgeschlossen. Die Fehlerbalken sind die Standardfehler über die ausgewerteten Zellen

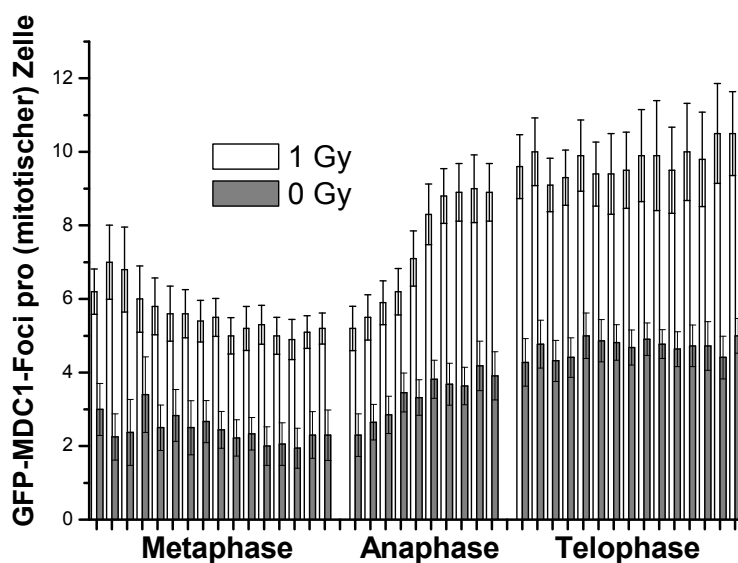


Abb. 37: Quantifizierung von GFP-MDC1 Foci in der Lebendzellmikroskopie. U-2 OS GFP-MDC1 Zellen wurden in μ Slides ausgesät und 48h später wurde die Aufnahme bestrahlter und unbestrahlter Zellen begonnen. Nach 1 Gy wurden 18, nach 0 Gy 10 dekonvolvierte Filme ausgewertet. Nach der Auswertung wurden die individuell unterschiedlich langen Mitosephasen durch Strecken und Auffüllen auf gleiche Länge gebracht. Ungewöhnlich lange Mitosephasen wurden ausgeschlossen. Die Fehlerbalken sind die Standardfehler über die ausgewerteten Zellen

Werte kommen durch die normale inter-individuelle Streuung zustande, aber auch dadurch, dass Zellen zu unterschiedlichen Zeiten nach Bestrahlung in die Mitose eingetreten waren. Dennoch entsteht der Eindruck, dass die Foci-Werte während der Anaphase ansteigen und in Telo- und G1-Phase höher liegen als zu Beginn der Mitose. Schließlich wurden die Foci-Werte aller Zellen gemittelt und gegen die manipulierte Zeitachse aufgetragen (Abb. 37). Die zur Kontrolle aufgenommenen, unbestrahlten Zellen wurden in identischer Weise ausgewertet und dargestellt.

In Pro- und Metaphase nehmen die Foci-Zahlen geringfügig ab, was vermutlich auf andauernde Reparatur der DSBs zurückzuführen ist. In der anschließenden Anaphase steigt die Zahl der Foci in bestrahlten Zellen sprunghaft von ca. 5,5 auf 10-11 Foci pro Zelle an. In der Telophase wird diese Foci-Zahl mit leicht steigender Tendenz gehalten. In den unbestrahlten Kontrollzellen nimmt die Foci-Zahl ebenfalls über die Anaphase zu und verdoppelt sich, ähnlich zu den induzierten Foci von 2,5 auf 5 Foci pro Zelle.

Die Verfolgung einzelner lebender Zellen durch die Mitose verdeutlicht, dass sowohl in bestrahlten als auch in unbestrahlten Zellen die Zahl der GFP-MDC1-Foci während der Anaphase zunimmt. Neben der Induktion von Anaphase-Brücken nach Bestrahlung in G2 und der hohen Rate spontaner GFP-53BP1-Foci in früh G1, geben diese Daten auf Grundlage der GFP-MDC1-Foci-Entwicklung Hinweise auf die Entstehung von zusätzlichen DSBs während der Mitose.

4.4.3 Verteilung von GFP-MDC1 Foci auf die Tochterzellen

Die Beobachtungen, dass in der Mitose zusätzliche Foci entstehen und sich durch Bestrahlung in G2 Anaphase-Brücken induzieren lassen, deuten auf einen Mechanismus hin, bei dem in der Anaphase Strukturen reißen und zu neuen DSBs führen. Ein solcher Mechanismus müsste sich auch auf die Verteilung der Foci auf die Tochterzellen auswirken, da durch ihn immer beide Chromatiden geschädigt wären. Die Schäden würden immer paarig auf die Tochterzellen verteilt werden. Der Unterschied zwischen der Anzahl der Foci zweier Schwesterzellen müsste somit kleiner sein, als nach einer zufälligen Aufteilung von DSBs im Zuge der Zellteilung zu erwarten wäre.

Teilt sich eine Zelle mit DSBs, so ist zu erwarten, dass die Foci zufällig auf die Chromatiden und somit zufällig auf die beiden Tochterzellen verteilt werden. Das stochastische Modell dazu entspricht dem „Ziehen von Kugeln mit Zurücklegen“. Es gibt eine schwarze und eine weiße Kugel, wobei die beiden Farben den zwei Tochterzellen entsprechen. Die zu erwartende Aufteilung von n Foci auf die Tochterzellen (schwarz-weiß-Kombinationen) folgt einer Binomialverteilung. Prozesse, deren Ergebnisse einer Binomialverteilung folgen, nennt man Bernoulli-Prozesse bzw. -Experimente. Gemäß dieser zu erwartenden Verteilung lässt sich eine statistisch zu erwartende Focizahl-Differenz zwischen zwei Tochterzellen berechnen, die lediglich von der Anzahl n der zu verteilenden DSBs abhängt. Berechnet man positive und negative Differenzen zwischen den Zellen, ist diese zu erwartende mittlere Foci-Differenz einer größeren Population gleich Null. Rechnet man jedoch mit dem Betrag der Differenzen erhält man

eine positive zu erwartende mittlere Differenz, die mit der Anzahl der zu verteilenden Foci ansteigt (**Tabelle 8**). Diese Liste wurde herangezogen, um zu beurteilen, ob die gefundenen GFP-MDC1-Foci-Differenzen zwischen den Tochterzellen in der Lebendzellmikroskopie die statistisch zu erwartende Größe aufweisen. Wird im Einzelfall die zu erwartende Foci-Differenz und die tatsächlich zwischen zwei Tochterzellen vorhandene Foci-Differenz verglichen, ergibt sich meist ein Unterschied. Dieser Unterschied muss über die Standardabweichung der zugrundeliegenden Bernoulli-Verteilung normalisiert werden, um einen sog. Z-Wert zu erhalten.

$$\text{Z-Wert} = \frac{\text{gemessene Differenz} - \text{mittlere erwartete Differenz}}{\sqrt{\text{Varianz der erwarteten Verteilung der Differenzen}}}$$

Tabelle 8: Die bei zufälliger Verteilung zu erwartende mittlere DSB-Differenz zwischen zwei Tochterzellen

n	mittlere erwartete Differenz	Varianz der erwarteten Differenzen
1	1,00	0,00
2	1,00	1,00
3	1,50	0,75
4	1,50	1,75
5	1,88	1,48
6	1,88	2,48
7	2,19	2,21
8	2,19	3,21
9	2,46	2,94
10	2,46	3,94
11	2,71	3,67
12	2,71	4,67
13	2,93	4,40
14	2,93	5,40
15	3,14	5,13
16	3,14	6,13
17	3,34	5,85
18	3,34	6,85
19	3,52	6,58
20	3,52	7,58
21	3,70	7,31
22	3,70	8,31
23	3,87	8,04
24	3,87	9,04

Der Z-Wert gibt in Standardeinheiten an, wie weit der gemessene Wert vom Erwartungswert entfernt liegt. Der Z-Wert hat gegenüber der Abweichung von der erwarteten Foci-Differenz den Vorteil, dass er nicht von der Anzahl der zu verteilenden Foci abhängt. Dadurch ist es zulässig, die Z-Werte, die innerhalb einer Gruppe von Zellen ermittelt wurden, arithmetisch zu mitteln. Die Z-Werte wurden für GFP-MDC1-U-2 OS-Zellen errechnet, welche in G2 mit 1 Gy bestrahlt wurden, und zwischen 2-5 h nach Bestrahlung in die Mitose eintraten (vgl. Kap. 4.4.2). Die Zellen wurden kontinuierlich im Lebendzellmikroskop beobachtet, für die Z-Werte wurde aber jeweils nur ein Bild aus dem Stadium der Telophase verwendet. Dabei ergaben sich meist negative Z-Werte (Abb. 38). Bei 19 von 21 Zellen fiel die Differenz zwischen den Tochterzellen kleiner aus, als bei zufällig verteilten Foci zu erwarten wäre. Im Mittel liegt der Z-Wert der 21 Zellen bei -0,6. Diese statistische Auswertung in der Telophase weist somit darauf hin, dass die Verteilung der Foci

nicht dem Zufall unterliegt, sondern dass es einen Prozess gibt, der zu einer paarigen Verteilung der Foci auf die Tochterzellen führt.

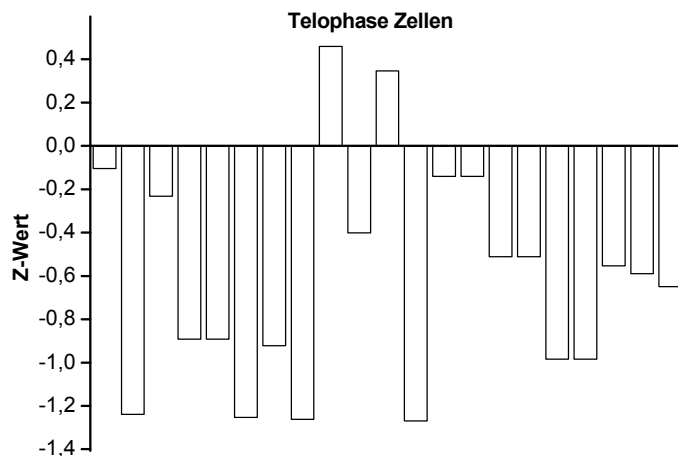


Abb. 38: Foci-Differenzen zwischen Tochterzellen in der Lebendzellmikroskopie. U-2 OS-GFP-MDC1-Zellen wurden in μ Slides ausgesät und 48 h später mit 1 Gy bestrahlt. 2-5 h später wurde eine Prophase-Zelle anhand morphologischer Merkmale im Durchlicht gesucht, und für 1,5 h im Minutenabstand mit dem 63x Objektiv aufgenommen. In der Telophase wurden die Foci der Tochterzellen gezählt und ein Z-Wert berechnet (siehe Text). Ein negativer Wert bedeutet, dass die Differenz zwischen den Tochterzellen kleiner ist als statistisch zu erwarten wäre.

4.4.4 Verteilung von γ H2AX-Foci auf die Tochterzellen

Die Generierung von Foci-Daten aus mitotischen GFP-MDC1-Zellen ist in der Lebendzellmikroskopie technisch sehr aufwändig. Um die bisherigen Daten anhand größerer Zellzahlen in einem unabhängigen Versuchsansatz zu validieren, wurde die Untersuchung der Verteilung von Foci auf Tochterzellen mit γ H2AX-Färbungen in fixierten Zellen fortgesetzt.

U-2 OS-Zellen wurden 48 h nach der Aussaat mit 1 Gy bestrahlt, mit Aphidicolin behandelt und 4 h später fixiert. Durch das Aphidicolin wurde ausgeschlossen, dass in der S-Phase bestrahlte Zellen ausgewertet wurden. γ H2AX wurde gefärbt und die Foci in Telophase-Zellen quantifiziert. Für die Foci-Verteilungen in den Telophasen wurden die Z-Werte berechnet (Abb. 39). 4 h nach Bestrahlung betrug der Z-Wert im Mittel -0,6, womit in etwa das Ergebnis aus der Lebendzellmikroskopie reproduziert war.

Um einen Zusammenhang zwischen in G2 stattgefundenener Reparatur und dem niedrigen Z-Wert zu überprüfen, wurden Z-Werte nach 0,3 Gy 0,5 h Reparatur untersucht. Dadurch konnte sehr viel weniger Reparatur stattfinden, bevor die Zellen in der Telophase untersucht wurden. Die Dosis wurde dazu der kürzeren Reparaturzeit angepasst, um eine zur langen Reparaturzeit vergleichbare Zahl von Foci (~20) in der Telophase zu untersuchen. Nach dieser Dosis findet kaum eine Checkpoint-Aktivierung, was aber von geringerer Bedeutung war, da die untersuchten Zellen bei Bestrahlung wahrscheinlich schon jenseits des Checkpoints waren.

Tatsächlich war ein höherer Z-Wert von -0,35 messbar, was dafür spricht, dass eine sehr kurze Reparatur die koordinierte Verteilung der Foci zwar nicht vollständig verhindert, aber massiv reduziert.

Um auszuschließen, dass systematische Fehler in den experimentellen Bedingungen oder der Auswertung enthalten sind, wurden die Z-Werte für definitiv zufällige Werte-Paare errechnet. Dafür wurden die nach 0,3 Gy und 0,5 h ermittelten Foci-Wert-Paare einander neu, nach dem Zufallsprinzip, zugeordnet. Der mittlere Z-Wert dieser Werte-Paare betrug -0,075 und somit nahezu dem Wert, der bei einer zufälligen Verteilung zu erwarten ist. Dies bekräftigte die Richtigkeit der Auswertung der Z-Werte.

Um zu untersuchen, ob Foci nur nach Bestrahlung oder auch in unbestrahlten Zellen koordiniert verteilt

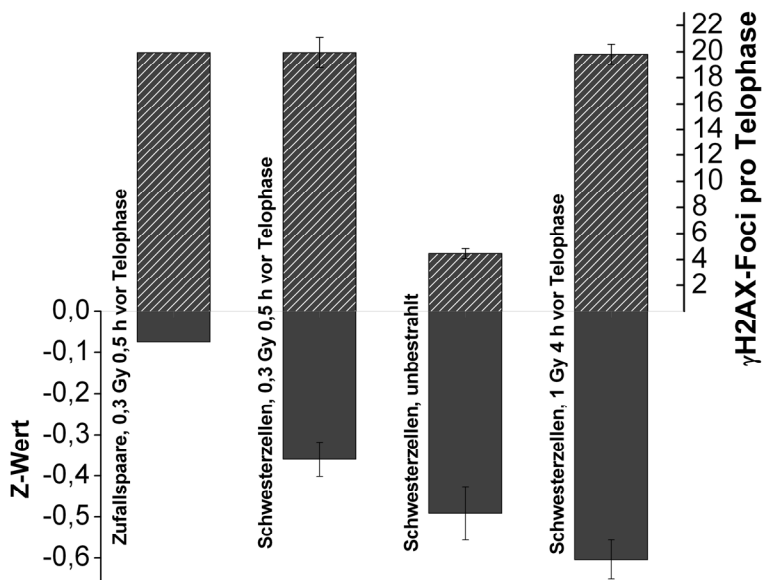


Abb. 39: Z-Werte basierend auf γ H2AX-Foci in der Telophase. U-2 OS WT-Zellen wurden 48 h nach der Aussaat mit 0,3 Gy bzw. 1 Gy bestrahlt und mit Aphidicolin behandelt. 0,5 h bzw. 4 h später wurden die Zellen fixiert und γ H2AX für die Immunfluoreszenz gefärbt. Über die Intensität und die Kontur der DAPI-Färbung wurden die Telophasen im Scanning-Mikroskop identifiziert um dann manuell die Foci der beiden Tochterzellen zu zählen. Für die Zufallspaare wurden Werte für Tochterzellen zufällig gepaart und Z-Werte berechnet. Die Fehlerbalken sind Standardfehler über mind. 3 unabhängige Versuche.

werden, wurden Z-Werte von unbestrahlten Zellen in der Telophase ermittelt. Unbestrahlte Zellen zeigten mit -0,5 zwar eine niedrigere als bestrahlte, aber immer noch hohe Korrelation. Dies verdeutlichte, dass der Mechanismus der koordinierten Verteilung nicht nur nach Bestrahlung in G2 von Bedeutung ist. Dieses Erkenntnis deckt sich gut mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, welche die Ursache für Anaphase-Brücken in replikativem Stress sehen (Chan et al. 2007). Obwohl hier mit Aphidicolin verhindert wurde, dass S-Phase-bestrahlte Zellen in die Mitose gelangen, haben die ausgewerteten Zellen zuvor die S-Phase durchlaufen und enthalten somit evtl. *entanglements* und spontane DSBs, die zu Anaphase-Brücken führen können. Bedenkt man die hohe Foci-Zahl in der frühen G1-Phase (Abb. 18), hätte man die stark koordinierte Verteilung der spontanen Foci sogar erwarten können.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Verteilung von Foci auf die Tochterzellen laut der gemessenen Z-Werte nie ein reiner Zufallsprozess ist. Ein Teil der Foci wird immer koordiniert verteilt.

Interessanterweise wird der Anteil koordiniert verteilter Foci erhöht, wenn die Zellen Gelegenheit zur Reparatur der DSBs in G2 bekommen. Die zuvor untersuchte Induktion von Anaphase-Brücken durch Bestrahlung in G2 und der Anstieg der Foci-Zahlen in der Anaphase legen nahe, dass die Anaphase-Brücken auch die koordinierte Verteilung verursachen.

4.5 Verteilung von γ H2AX-Foci auf die Tochterzellen, nach Inhibition der HR

Die Messung der Z-Werte deutete darauf hin, dass Foci in mitotischen Zellen nicht zufällig auf die Tochterzellen verteilt werden. Der Anteil koordiniert verteilter mitotischer Foci konnte durch Bestrahlung und Reparatur in G2 erhöht werden (Abb. 39). Da gleiches für die Entstehung von Anaphase-Brücken gefunden wurde, konnten Anaphase-Brücken als wahrscheinliche Ursache der koordinierten Verteilung mitotischer Foci angesehen werden. Durch die Inhibition der HR konnte nachgewiesen werden, dass die HR, zumindest teilweise, an der Entstehung von Anaphase Brücken beteiligt ist, da die Anaphase-Brücken-Frequenz mit der Zahl resektierter DSBs in G2 zurückging (Abb. 32). Wenn Anaphase-Brücken den Mechanismus der koordinierten Verteilung darstellen, sollte eine Inhibition der HR ebenfalls zu einem geringeren Anteil koordiniert verteilter Foci in der Mitose führen. In abschließenden Experimenten sollte der Zusammenhang zwischen der HR in G2 und in der koordinierten Verteilung von Foci in der Mitose untersucht werden. Dazu wurden 48 h nach Aussaat 82-6 hTert-Zellen bestrahlt und mit Aphidicolin behandelt. Die Hälfte der Ansätze wurde mit ATMi behandelt, um die Initiierung der Resektion der DSB-Enden, und damit die Reparatur der DSBs über HR zu verhindern. Nach einigen Versuchen mit U-2 OS-Zellen wurden die Versuche mit 82-6 hTert-Zellen durchgeführt, da der zur Inhibition der HR verwendete ATMi in diesen Zellen besser zu wirken schien.

Um die Unterbindung der HR durch ATMi zu überprüfen, wurden in jedem Versuch auch Zellen nach 1 Gy und 2 h fixiert. Nach der Färbung von RAD51 für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde die Anzahl der RAD51-Foci in G2 ohne und mit ATMi bestimmt (Abb. 40 links). Der Inhibitor bewirkte eine Reduzierung von 12,5 Foci in unbehandelten Zellen auf ca. 6 Foci pro Zelle. Analog zum vorherigen Einsatz des ATMi war zwar keine komplette Unterbindung dieses Reparaturweges, aber eine deutliche Reduktion der über HR reparierten DSBs zu sehen. Aufgrund der etwas langsameren Aufhebung des G2/M-Checkpoints in 82-6 hTert-Zellen wurden die Reparaturzeiten gegenüber den Experimenten mit U-2 OS-Zellen angepasst. Die Zellen wurden zu Ermittlung der Z-Werte 6 h nach 1 Gy, bzw. 1 h nach 0,3 Gy Bestrahlung fixiert. Im Anschluss wurde γ H2AX für die Immunfluoreszenzmikroskopie gefärbt. Analog zu Kapitel 4.4.4 wurden die Z-Werte in den Telophasen unbestrahlter Zellen, kurz und lang reparierender Zellen jeweils mit und ohne ATMi ausgewertet (Abb. 40 rechts). Ohne ATMi liegt der mittlere Z-Wert kurz reparierender Zellen 1 h nach 0,3 Gy knapp oberhalb -0,4. Ähnlich groß fällt die Koordination der Foci-Verteilung unbestrahlter

Zellen aus. Die Gründe für eine koordinierte Verteilung mitotischer Foci in diesen Ansätzen wurden im vorigen Kapitel besprochen. Die Koordination der Foci-Verteilung in Telophasen 6 h nach 1 Gy ist deutlich größer, der Z-Wert liegt bei -0,7, was nochmals die Bedeutung der Reparatur in G2 für die koordinierte Verteilung mitotischer Zellen bestätigt.

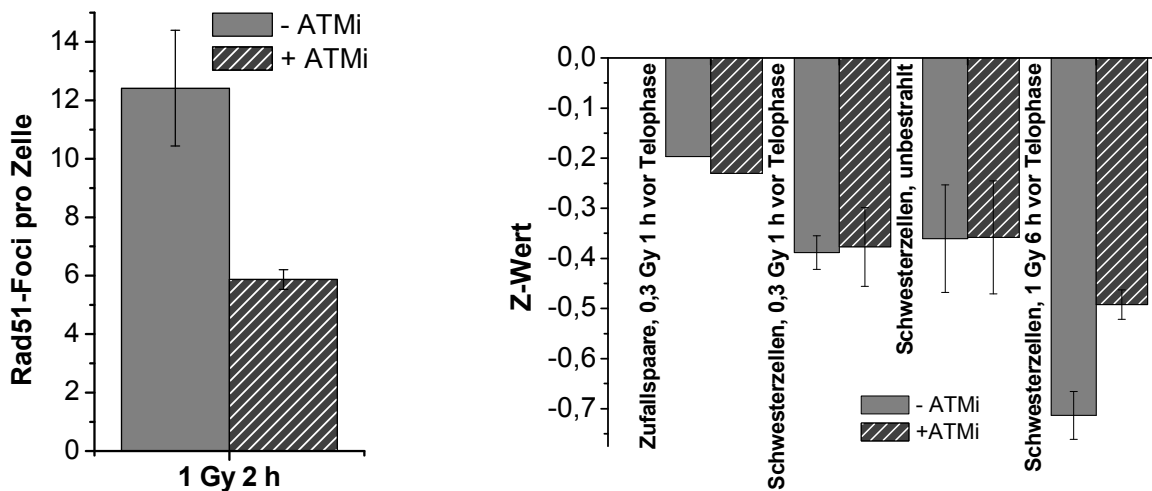


Abb. 40: Messung der Z-Werte mittels γ H2AX-Foci in der Telophase. Links: 82-6 hTert-Zellen wurden 48 h nach der Aussaat teilweise mit ATM-Inhibitor behandelt, mit 1 Gy bestrahlt und nach 2 h fixiert. RAD51-Foci wurden gefärbt und in G2-Zellen quantifiziert. Rechts: 82-6 hTert-Zellen wurden 48 h nach der Aussaat teilweise mit ATM-Inhibitor behandelt und 30 min später mit 0,3 Gy bzw. 1 Gy bestrahlt und mit Aphidicolin behandelt. 1 h bzw. 6 h später wurden die Zellen fixiert und γ H2AX immunfluoreszent gefärbt. Über die Intensität und die Kontur der DAPI-Färbung wurden die Telophasen im Scanning-Mikroskop identifiziert, um dann manuell die Foci zu zählen und die Z-Werte zu berechnen. Für die Zufallspaare wurden Werte für Tochterzellen zufällig gepaart und Z-Werte berechnet. Die Fehlerbalken sind Standardfehler über mind. 3 unabhängige Versuche.

Nach ATMi-Behandlung ist die Koordination der Foci-Verteilung nach allen Bedingungen unbeeinflusst. Lediglich nach 1 Gy und 6 h Reparatur steigt der Z-Wert nach ATMi-Behandlung von -0,7 auf -0,5 und liegt somit nahe dem Level der kurz reparierenden Zellen. Somit wurde in der Population, in der die HR zur Entstehung koordinierter Foci-Verteilung in der Mitose beitragen konnte, durch Inhibition der HR die Zahl der koordiniert verteilten Foci gesenkt.

Das Ergebnis dieser Experimente bekräftigt somit das Modell zur DSB-Entstehung in der Mitose. In der Anaphase findet ein sprunghafter Anstieg der Foci-Zahl bestrahlter wie unbestrahlter Zellen statt, wie in der Lebendzellmikroskopie beobachtet werden konnte. Ein Teil dieser in der Telophase zu findenden Foci wurde nicht zufällig auf die Tochterzellen verteilt, sondern durch einen Mechanismus, der gleichzeitig Schäden in beiden Tochterzellen erzeugt. Sehr wahrscheinlich handelt es sich bei diesem Mechanismus um Anaphase-Brücken und deren Reißen. Weiter kann die Induktion von Anaphase-Brücken als auch die Koordination der Verteilung mitotischer Foci durch Inhibition der HR in G2 vermindert werden. Dies legt

nahe, dass die Reparatur von DSBs über HR eine Ursache für die Entstehung von Anaphase-Brücken ist. Die genauen Vorgänge müssen aber noch in weiterführenden Arbeiten untersucht werden.

5 Diskussion

Das erste Kapitel der Diskussion wird sich mit den Unterschieden zwischen klassischen Methoden und den in der Arbeit verwendeten Methoden der Lebendzellmikroskopie beschäftigen. Diskutiert wird, in wie weit die Methoden vergleichbar sind und wo durch die Technik Unterschiede in den Versuchsergebnissen entstehen. Weitere Kapitel diskutieren die Ergebnisse zur Untersuchung von DNA-Reparatur und Zellzyklusverhalten am G2/M-Checkpoint. Die Ergebnisse werden auf Konsistenz überprüft und in die aktuelle Literatur eingeordnet.

5.1 Etablierung der Lebendzellmikroskopie

5.1.1 Das Lebendzellmikroskop

Um das Checkpointverhalten oder die DNA-Reparatur in der Lebendzellmikroskopie zu untersuchen, müssen Versuche über lange Zeiträume durchgeführt werden. Der Zellzyklus der in dieser Arbeit untersuchten humanen Zelllinien dauert ca. 24 h, und über eine ähnlich lange Zeitspanne wurden auch die Versuche durchgeführt. Bei Kontrollversuchen zur Messung des MI wurde die Kultur für 24 h aufgenommen, bei Versuchen zur DNA-Reparatur-Messung am G2/M-Checkpoint meist 14 h. Diese langen Versuche sind nur möglich, wenn die Zellen während der Aufnahme nicht gestört oder geschädigt werden. Ansonsten zeigen sie ein anderes Checkpoint-Verhalten, eine verzögerte DNA-Reparatur oder sie sterben. Daher wurde zu Beginn der Arbeit viel Zeit zur Optimierung der Kultivierungs- und Mikroskopie-Bedingungen aufgewendet. Eine wichtige Voraussetzung für das Überleben der Zellen ist das konstante Volumen des Mediums. Alle Entwicklungen, welche die CO₂-Inkubation und das Anfeuchten der Luft betreffen, wurden bereits beschrieben (Kap. 4.1.1) und verändern, von einem etwas schlechteren Phasenkontrast-Bild durch den CO₂-Deckel abgesehen, nicht die Mikroskopie der Zellen.

Die Anwendung niedrigerer Lampenintensitäten und kurzer Belichtungszeiten wurde in den ersten Versuchen getestet und als unverzichtbar für eine lange, schonende Aufnahme der Zellen befunden. Diese Aufnahmebedingungen beeinflussen allerdings die Mikroskopie und sind in den entsprechenden Passagen immer wieder genannt z.B. als Grund geringerer Foci-Detektion.

Eine weitere Maßnahme für die schonende Aufnahme ist der verwendete Mikroskop-Typ. Für dieses Projekt wurde ein Weitfeld-Mikroskop verwendet. Bei Weitfeld-Mikroskopen wird ein ganzes Bildfeld einmalig belichtet und über eine klassische Kamera mit CCD-Chip aufgenommen. Die Alternative dazu wäre ein konfokales Mikroskop, bei dem das Bildfeld in einem Schema, Punkt für Punkt angeregt, und das

entstehende Signal über einen Photomultiplier aufgezeichnet wird. Der Vorteil eines Punkt-Scanners ist der Einsatz einer Lochblende, die störende Signale aus benachbarten Fokus-Ebenen effizient beseitigen kann und somit die Bildqualität verbessert. Nachteile dieser Systeme sind neben dem höheren Preis jedoch die hohen Laser-Intensitäten, die bei der punktförmigen Anregung verwendet werden, sowie die geringere Geschwindigkeit bei der Aufnahme eines Bildes. Nimmt man eine schlechtere Bild-Qualität in der Weitfeldmikroskopie in Kauf, kann man sogar doppelt sparen. Ohne die Lochblende können die Bildebenen eines Bilderstapels in größeren Abständen angeordnet werden, ohne dass Signale dazwischen verloren gehen. Die große Tiefenschärfe kann also genutzt werden, um die Anzahl der Bildebenen zu reduzieren und somit weniger belastend und schneller zu arbeiten.

Eine weitere Voraussetzung zur Messung von Reparatur- und Checkpoint-Verhalten ist die Beobachtung einer großen Zahl an Zellen, was ein schnelles Aufnehmen und eine intelligente Handhabung multipler Positionen auf dem Objektträger voraussetzt.

Die für die Lebendzellmikroskopie eingesetzte Scanning-Software Metafer, ermöglichte ein schnelles und flüssiges Anfahren zahlreicher Positionen. Dadurch wurde unnötige Belastung der Positionen verhindert und es konnte auf den Einsatz eines zusätzlichen *Shutters* in der Epi-Fluoreszenz verzichtet, da die während der Aufnahme auftretenden Wartezeiten nur kurz waren. Weiter war die somit erreichte Schnelligkeit wichtig, um einen größeren Durchsatz zu erreichen und somit nach wenigen Versuchen die statistische Auswertungen einer großen Zahl an Zellen durchzuführen.

5.1.2 Der MI in der Lebendzellmikroskopie

Die Untersuchung des Zusammenspiels von DNA-Reparatur und Zellzyklusverhalten am G2/M-Übergang stellte besondere Anforderungen an die in dieser Arbeit etablierte Lebendzellmikroskopie. Bereits kleinste Störungen in den Umweltparametern Temperatur, pH-Wert und Austrocknung, aber auch durch die mikroskopische Beobachtung hemmen die Zellen in ihrer Proliferation. Zur Messung einer solchen Störung wurde der MI gewählt, da dies ein einfach messbarer Endpunkt ist, der Störungen des Zellzyklusverhaltens in jeder Phase des Zellzyklus detektiert. Der MI reagiert nicht nur auf die Aktivierung des G2/M-Checkpoints, sondern wird auch zeitversetzt durch eine Störung in G1- oder S-Phase beeinträchtigt.

Bei der Interpretation des MI in der Lebendzellmikroskopie sind Unterschiede zu klassischen Ansätzen zur Ermittlung des MI in der Durchflusszytometrie zu berücksichtigen. Im Phospho-H3-Assay werden Zellen unbestrahlt oder zu unterschiedlichen Zeiten nach Bestrahlung fixiert und gefärbt. Zur Zellerkennung wird der DNA-Farbstoff Propidiumiodid verwendet. Ein Antikörper gegen phosphoryliertes Ser10 des Histon3 wird verwendet, um mitotische Zellen spezifisch zu färben. Die Zählung aller Zellen findet im Durchflusszytometer statt, in dem sich die immunfluoreszent gefärbten Mitosen diskriminieren lassen (Abb. 41). Der MI ist hier der Anteil der Zellen, der sich zum Zeitpunkt der Fixierung in der Mitose befindet hat.

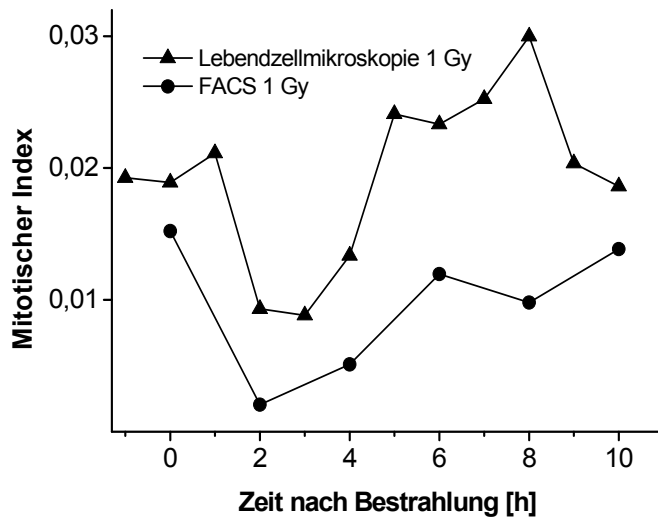


Abb. 41: U-2 OS-Zellen wurden 48 h nach Aussaat mit 1 Gy bestrahlt und im Anschluss über einen Zeitraum von 10 h der MI bestimmt. Die Kinetiken entstammen der Abb. 22 und der Abb. 25. In der Lebendzellmikroskopie wurde der MI über die pro Stunde zählbaren Zellteilungen ausgewertet, im FACS wurden die zur angegebenen Zeit phospho-H3 positiven Zellen quantifiziert.

Im Unterschied dazu wird der MI in der Lebendzellmikroskopie über die Zahl der innerhalb einer Stunde beobachteten Zellteilungen bestimmt. Als kurzes, morphologisch gut erkennbares Ereignis wird dafür die tatsächliche Trennung der Tochterzellen gewertet. Möglich wäre auch die Zählung abgekugelter, mitotischer Zellen. Beim Testen dieser Auswertungsweise wurden Zellen jedoch oftmals doppelt gewertet, da sie nicht selten ca. 1h, d.h. in 4 Aufnahmezyklen à 15 min abgekugelt vorlagen. Dies würde also zu einer Überschätzung des MI in der Lebendzellmikroskopie führen.

Abb. 41 zeigt den im FACS und in der Lebendzellmikroskopie gemessenen MI von U-2 OS Zellen. Der im FACS ermittelte MI ist in der Kontrolle etwas niedriger als in der Lebendzellmikroskopie. Die Absolutwerte, die in der Lebendzellmikroskopie erzielt werden, hängen neben dem Anteil sich teilender Zellen auch von der Zeit ab, über die man die sich teilenden Zellen summiert. Da in diesen Zellen die Mitose ca. 1 h dauert, führt ein Summieren über diesen Zeitraum zu vergleichbaren Absolutwerten in beiden Methoden. Unterschiede zwischen den Methoden sind aber weiterhin beim Zeitpunkt des Abfalls des MI nach Aktivierung des G2/M-Checkpoints zu erwarten. Andere Arbeiten haben gezeigt, dass der im FACS ermittelte MI schon 1 h nach Bestrahlung deutlich auf die Aktivierung des G2/M-Checkpoints reagiert (Deckbar et al. 2007, Fernandez-Capetillo et al. 2002), da viele Zellen zu diesem Zeitpunkt die Mitose verlassen haben, und der G2/M-Checkpoint schon aktiv ist. Dagegen enthält der 1 h-Punkt in der Lebendzellmikroskopie die Summe der die Mitose verlassenden Zellen der ersten h nach Bestrahlung, und diese Summe ist unverändert hoch, da die Mitose ca. 1 h dauert. Erst in der zweiten h ist die Summe abgeschlossener Mitosen niedriger als in der unbestrahlten Population. Diese verzögerte Reaktion des MI aus der Lebendzellmikroskopie ist generell auch bei der Aufhebung der Checkpoints zu erwarten. Da die

Aufhebung jedoch nicht so abrupt erfolgt wie das Einsetzen, ist der Effekt auch nicht gut im Vergleich der beiden Kurven zu sehen.

Bei einer etablierten Lebendzellmikroskopie ist die Charakterisierung des MI unter dem Mikroskop eine exakte, elegante Lösung die evtl. der klassischen Methode der Messung im FACS vorzuziehen ist. Die Zellkultur ist einfacher, da man nur einen Bruchteil der Zellzahl und Ansätze benötigt, die man für das FACS aussät. Nicht unwesentlich ist auch die Einsparung von Medium, Inhibitoren und Transfektions-Chemikalien. Nach der Bestrahlung und dem Start des Mikroskops gibt es keinen weiteren experimentellen Aufwand weil die Fixierung der Zellen entfällt. Da durchgängig die gleiche Kultur ausgewertet wird, gibt es keine Unterschiede in der Handhabung und keine Lücken in der Auswertung.

5.1.3 Zellzyklusbestimmung in der Lebendzellmikroskopie

In der DNA-Reparaturforschung ist es essentiell, die Zellzyklusposition einer zu untersuchenden Population zu kennen, da sich die benutzten Reparaturwege und auch der DNA-Gehalt mit der Zellzyklusphase verändern. Bei klassischen Methoden werden unterschiedliche Mittel eingesetzt, um Zellen einer bestimmten Zellzyklusphase auszuwerten. Bei Auswertung nicht proliferierender G0-Zellen ist die Zellzyklusphase immer bekannt. Man kann die Zellen in einer Zellzyklusphase synchronisieren und während der Reparaturzeit über FACS-Untersuchungen die jeweils aktuelle Zellzyklusphase abschätzen. Eine andere, in der DNA-Reparaturforschung oft verwendete Methode ist die Färbung von Zellzyklusmarkern (z.B. CENPF oder BrdU) für die mikroskopische Auswertung. Eine weitere Methode zur Bestimmung der Zellzyklusphase über das DAPI-Signal fixierter Zellen wurde bereits beschrieben (Kap. 3.4.4). Der experimentelle Aufwand steigt noch, wenn man beides, die Phase der Behandlung und die Phase der Auswertung kennen muss.

Bei der Analyse der DSB-Reparatur am G2/M-Übergang mittels Lebendzellmikroskopie konnte auf jegliche weitere Färbe- oder Synchronisationstechnik verzichtet werden. Der Übergang von G2 nach M ist an der Zellmorphologie in den Durchlicht-Bildern zu erkennen. Eleganter Weise lassen sich alle weiteren Informationen aus den Filmen entnehmen. Wurde die Zelle bei der Zellteilung beobachtet, war sie in den Bildern zuvor in S/G2 und in den Bildern danach in G1. Über die Bestimmung der Zellzyklusphase hinaus konnten auf Ebene der individuellen Zelle auch genauere Daten erhoben werden, so z.B. der Zeitpunkt der Checkpoint-Aufhebung nach Bestrahlung. Auf diese Weise ersetzt die Lebendzellmikroskopie gleich eine Reihe von Tools, die für die Analyse fixierter Zellen wichtig sind.

Diese Methodik bietet neue und faszinierende Möglichkeiten der Auswertung einzelner Zellen, und es fällt auf, dass die Zellen sich mitnichten alle gleich verhalten. Erst mit der Lebendzellmikroskopie ist die ganze Bandbreite zellulärer Reaktionen auf die gleiche Behandlung sichtbar.

5.2 Die Untersuchung der DSB-Reparatur in der Lebendzellmikroskopie

5.2.1 Unterschiede in der GFP-53BP1-Signalqualität während des Zellzyklus

Die DNA-Reparatur am G2/M-Übergang wurde anhand von GFP-53BP1-Foci in der Lebendzellmikroskopie untersucht. Bei ersten Experimenten stellte sich heraus, dass weniger GFP-53BP1-Foci gezählt wurden als aus der Analyse fixierter Zellen bekannt ist (Abb. 16 und Abb. 27). Dies ist darauf zurückzuführen, dass mit dem Ziel, Zellen möglichst lange in der Lebendzellmikroskopie zu beobachten, ohne DSBs zu induzieren oder das Zellzyklusverhalten zu beeinflussen, sehr schonende Aufnahmebedingungen gewählt wurden. Diese Aufnahmebedingungen beinhalteten sehr geringe Lampenintensitäten von 6-25% der Quecksilber-Dampfdrucklampe und kurze Belichtungszeiten, wodurch die Bilder aus der Lebendzellmikroskopie nur relativ schwache Signale enthielten. Zusammen mit dem in den Zellkernen vorliegenden Hintergrund durch pannukleär verteiltes GFP-53BP1, erklären diese schonenden Aufnahmebedingungen die Detektion geringerer Foci-Zahlen in der Lebendzellmikroskopie. Eine vergleichbare Messung in der Lebendzellmikroskopie findet sich bei Chen et al. 2009. 1 Gy γ -Strahlung induzierte dort ca. 19 YFP-53BP1-Foci in HT 1080-Zellen (Asaithamby und Chen 2009). Die Aufnahmen wurden jedoch mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen und anschließend dekonvolviert. Die Zellzyklusphase der ausgewerteten Zellen wird nicht genannt, lediglich, dass es sich um eine exponentiell wachsende Kultur gehandelt hat. Eigene Versuche mit proliferierenden Zellen derselben Zelllinie, ergaben eine Induktion von 24 YFP-53BP1-Foci nach 1 Gy in G2-Zellen. Zu vermuten ist, dass bei der Auswertung von Chen et al. G1- und G2-Zellen vermischt wurden. Durch die etwas bessere Foci-Detection in der Konfokal-Mikroskopie wurden dann 19 Foci pro Zelle ermittelt, was aber immer noch weniger ist, als unter unseren Bedingungen für G2-Zellen gezählt wurde. Deutlich wird, dass auch unter den bei Chen et al. gewählten Aufnahme-Bedingungen in der Lebendzellmikroskopie nicht die Foci-Zahlen ermittelt werden, die aus der Analyse fixierter Zellen bekannt sind. Es ist wichtig für die Analyse der DNA-Reparatur über Foci aus der Lebendzellmikroskopie, dass das Verhältnis der Foci-Zahlen aus fixierten Zellen und lebenden Zellen sich nicht mit der Reparaturzeit verändert. Betrachtet man die G1-Kinetiken aus Abb. 16 und Abb. 27, bleibt das Verhältnis (fixiert/lebend) bei der Induktion (=3) annähernd gleich zum Verhältnis 7 h nach der Bestrahlung (=2,8).

Wenn man schwache Signale zählt und rigoros jeden helleren Fleck als Fokus wertet, macht man sich in starkem Maße von der Signalqualität der Bilder abhängig, da sich eine Änderung der Signalqualität sofort in ein anderes Ergebnis der Auswertung übersetzt. Daher wurde zum einen viel Aufmerksamkeit auf eine vergleichbare Signalqualität zwischen den Versuchen verwendet, zum anderen wurden Kontrollexperimente durchgeführt, um die Signalqualität in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen einschätzen zu können. Dabei wurde beobachtet, dass sich die Signalqualität des GFP-53BP1-Konstruktes

im Laufe des Zellzyklus massiv verändert. So sind die Foci in G1 wesentlich prägnanter und die Zellkerne beinhalten weniger unspezifisches Hintergrundsignal als gleich bestrahlte Zellen in G2. Eigene Experimente mit γ H2AX und anderen DSB-Markern in der Immunfluoreszenz konnten diese Veränderungen in der Signalqualität auch für fixierte Zellen bestätigen. Die zweite drastische Veränderung der Signalqualität findet in und um die Mitose statt. 53BP1 und damit auch das GFP-Konstrukt ist generell während der Mitose nicht am DSB lokalisiert. D.h. 53BP1 trennt sich zu irgendeinem Zeitpunkt vor der Mitose vom DSB und kehrt nach der Mitose zurück. Diese Beobachtung haben auch andere Arbeitsgruppen gemacht (Giunta et al. 2010, Nelson et al. 2009). Das Verschwinden bzw. Erscheinen des Signals darf nicht mit der Reparatur bzw. der Entstehung von Schäden verwechselt werden. Die Entwicklung der Signalqualität im Zellzyklus konnte durch die in Abschnitt 4.1.6 durchgeführte Messung von Signal- und Hintergrundintensität in bestrahlten Zellkernen abgebildet werden. In G2 (die letzten 6 h vor Mitose) ist das Verhältnis von Foci-Signal zu Hintergrund konstant bis direkt vor der Mitose. D.h. die Signalqualität ist in dieser Zeit keiner signifikanten Veränderung unterworfen und beeinflusst nicht die Auswertung des Schadensignals. Lediglich das letzte Bild vor der Mitose könnte von dem dann raschen Ablösen des 53BP1 vom DSB beeinflusst sein. Eine plötzliche Abnahme der Foci-Zahl im letzten Bild vor der Mitose ist sowohl in bestrahlten, als auch in unbestrahlten G2-Zellen zu finden. (Abb. 18 und Abb. 29). In der frühen G1-Phase (die ersten 5h nach Mitose) ist das Verhältnis von Signal und Hintergrund nicht konstant. Die Signalqualität wird innerhalb dieser Zeit ständig besser. Diese Steigerung in der Signalqualität geht einher mit einer Zunahme spontaner 53BP1-Foci, was sowohl in der Lebendzellmikroskopie als auch in fixierten Zellen beobachtet werden kann (Abb. 18 und Abb. 21). Die Zahl an γ H2AX-Foci nimmt in diesem Zeitraum nur unwesentlich zu. Ca. 5 h nach der Mitose sind in etwa gleich viele 53BP1- und γ H2AX-Foci pro Zelle zu finden (Abb. 21). Andere Arbeitsgruppen haben die Induktion von Schadensfoci während der Mitose untersucht und ebenfalls die spätere Lokalisation von 53BP1 zum DSB beobachtet (Giunta et al. 2010).

Somit ist davon auszugehen, dass die Anzahl von GFP-53BP1-Foci in der frühen G1-Phase nicht der tatsächlichen Anzahl an DSBs entspricht, sondern diese unterschätzt. Die in G2 ermittelten Foci-Zahlen sind zwar kleiner als die in fixierten Zellen ermittelten Werte, innerhalb der G2-Phase treten jedoch keine Schwankungen auf, bis sich das 53BP1 in der Prophase vom DSB löst.

5.2.2 Die primäre Schadensantwort während der Mitose

Ziemlich bald nach Beginn der lebendzellmikroskopischen Aufnahmen fiel das Fehlen des 53BP1-Signals in mitotischen Zellen auf. Eine Literatursuche führte zu dem Zeitpunkt nicht zu weiteren Erkenntnissen über die Verteilung des 53BP1-Signals im Zellzyklus. Erst in jüngerer Zeit sind mehrere Publikationen erschienen, die das Vorhandensein von Foci-bildenden Proteinen in verschiedenen Zellzyklusphasen zum Thema haben. Nelson et al. (2009) berichten von Lebendzellmikroskopie-Versuchen, in denen keine

53BP1-Foci während der Mitose zu beobachten sind, und bestimmen den G2/M-Übergang als Zeitpunkt des 53BP1-Verschwindens. Nakamura et al. (2010) unternahmen eine Klassifikation verschiedener Foci-Proteine auf der Grundlage ihrer Lokalisation während der Mitose. γ H2AX und MDC1 bleiben während der Mitose am DSB während MRE11, NBS1 und 53BP1 sich vom Bruch lösen.

Die Arbeitsgruppe um S. Jackson untersuchte vor allem die Induktion der Foci während der Mitose und beobachtete, dass die Foci der betreffenden Faktoren in der Mitose auch nicht induzierbar sind (Giunta et al. 2010). In dieser Arbeit wurden auch mehrere Zelllinien (HeLa, BJ und MRC5) bezüglich der 53BP1-Lokalisation charakterisiert. Im Unterschied zur Gruppe um Nakamura wurde jedoch eine Kolo­kalisierung zwischen NBS1 und γ H2AX während der Mitose festgestellt. Unterschiedliche Aussagen zur Lokalisation von NBS1 könnten durch unterschiedlich sensitive Mikroskopiemethoden in den Arbeitsgruppen zustande kommen. Als Teil des MRN-Komplexes ist NBS1 an der DSB-Detektion beteiligt. Damit ist zu erwarten, dass NBS1 auch am DSB vorliegt. Die weitere Akkumulation von NBS1 für die Signal­amplifikation könnte jedoch in der Mitose eingeschränkt sein oder gar nicht stattfinden, womit die Foci-Detektion erschwert wäre.

Zum Mechanismus der Foci-Auflösung wurden besonders am Beispiel der 53BP1-Foci Überlegungen angestellt. Vor allem die Frage, ob die 53BP1-Dissoziation vom Bruch Bedingung oder Folge des Eintritts in die Mitose ist, wurde bearbeitet. Nelson et al. (2010) interpretierten die Foci-Kinetiken dahin gehend, dass die Zelle die Mitose nicht einleiten kann solange 53BP1-Foci vorliegen. Vieles spricht jedoch für eine umgekehrte Kausalität. (i) Es wäre möglich, dass die 53BP1-Bindung generell verhindert wird, da die entsprechenden Bindestellen, Lysine in Histon 3 und 4, nach Kondensation des Chromatins nicht mehr freiliegen. (ii) Weiterhin interagiert das in der Mitose hyperphosphoryliert vorliegende 53BP1 verstärkt mit MDC1, was die Bindung von 53BP1 an Histone verhindern könnte. (iii) Jackson et al. 2010 sehen im Verhalten vom 53BP1 eine Folge der Chromatin-Kondensation, da induzierte 53BP1-Foci sowohl bei chemisch induzierter Chromatin-Kondensation in G2 (*premature chromatin condensation* PCC), als auch bei Inhibierung der Checkpoint-Kinasen und somit frühzeitigem Eintritt in die Mitose verschwinden. Auch die Experimente in dieser Arbeit deuten auf das Verschwinden der 53BP1-Foci als Folge der Chromatin-Kondensation hin, da im Phasenkontrastbildern bereits die Kondensation zu beobachten ist, wenn die letzten 53BP1-Foci simultan verblassen. Jackson et al. 2010 zeigen ferner, dass die für 53BP1-Rekrutierung nötige Polyubiquitylierung von Histonen durch Ubiquitinligasen wie RNF8 und RNF168 in der Mitose unterbunden ist. Die Inhibierung dieser Ubiquitylierung beeinträchtigt bekannter weise in der Interphase sowohl die Rekrutierung von 53BP1 als auch von BRCA1 (Huen et al. 2010). Auch ist die Deubiquitylierung von Histonen eine bekannte Voraussetzung für Chromatin-Kondensation während der Mitose (Joo et al. 2007, Matsui et al. 1979). Unter Verwendung von GFP-Konstrukten weisen Giunta et al. (2010) die Abwesenheit von RNF8 und RNF168 während der Mitose nach, wodurch deutlich wird, dass in der Mitose die gesamte Rekrutierung weiterer Reparaturfaktoren *downstream* von γ H2AX und MDC1 unterbrochen wird. Diese Ergebnisse sprechen für eine zuverlässige Detektion von DSBs anhand von

53BP1-Foci in der Interphase. Erst mit Eintritt in die Mitose ändert sich abrupt das Signalling am DSB und die 53BP1-Foci verschwinden.

Jackson et al. (2010) interpretierten, dass die modifizierte Rekrutierung von Reparatur-Proteinen zu DSBs während der Mitose, der Markierung der DSBs dient. Weitere zelluläre Reaktionen wie Zellzyklus-Verzögerung, Chromatin-Öffnung oder Reparatur erfolgen jedoch nicht, da der Abschluss der Mitose Priorität hat und weitere Reaktionen kontraproduktiv wären.

5.2.3 Die verwendeten DSB-Marker im Vergleich

In dieser Arbeit wurden Foci mit Hilfe verschiedener DSB-Marker in der Lebendzellmikroskopie und in fixierten Zellen gezählt. Dabei wurden G2-, mitotische und G1-Zellen ausgewertet. Die Wahl des DSB-Markers richtete sich dabei nach der verwendeten Methode (fixierte oder lebende Zellen) und der Zellzyklusphase. Z.B. wurden in der Lebendzellmikroskopie GFP-53BP1-Foci in der Interphase ausgewertet, in der Mitose kamen jedoch GFP-MDC1-Foci zum Einsatz. Ein anderes Beispiel ist die Beobachtung koordiniert verteilter mitotischer GFP-MDC1-Foci, die in fixierten Zellen mit γ H2AX-Foci validiert wurde. Eine Gegenüberstellung der Foci-Level in den untersuchten Zellzyklusphasen sollte helfen, die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Foci-Daten zu beurteilen.

Die Foci-Level unbestrahlter U-2 OS-Zellen wurden aus unterschiedlichen Kontrollversuchen zusammengetragen und in Abb. 42 zusammen dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Foci-Werte vor und nach der Mitose wurden die Foci pro G2-DNA-Gehalt angegeben, also die Foci in einer G2-Zelle mit dem verdoppelten Wert einer G1-Zelle verglichen. Für die γ H2AX-Foci aus der Immunfluoreszenz liegen keine Informationen über die Position innerhalb einer Zellzyklusphase vor, deshalb wird nur ein durchschnittlicher Wert pro Zellzyklus-Phase angegeben (γ H2AX IF). Von G2 nach G1 erhöht sich die durchschnittliche Zahl an γ H2AX-Foci von ca. 3 auf ca. 4,5 Foci. Ähnlich verhält es sich mit den GFP-53BP1-Foci in fixierten Zellen (GFP-53BP1, fixiert). Zieht man die durchschnittlichen Foci-Zahlen der Zellzyklusphasen heran, beobachtet man generell weniger Foci, bei Auswertung des 53BP1 über die Mitose findet aber ebenfalls eine Verdoppelung von ca. 2 in G2 auf ca. 4 Foci in G1 statt. Der in der Lebendzellmikroskopie verwendete Marker in der Interphase (GFP-53BP1) liegt in G2 niedriger als die Zählungen in der Immunfluoreszenz. Dies liegt mit Sicherheit an der geringeren Detektion von Foci unter schonenden Aufnahmebedingungen. Das Abknicken der Kurve beim letzten Wert vor der Mitose ist auf das beginnende Ablösen des 53BP1 vom DSB zurückzuführen.

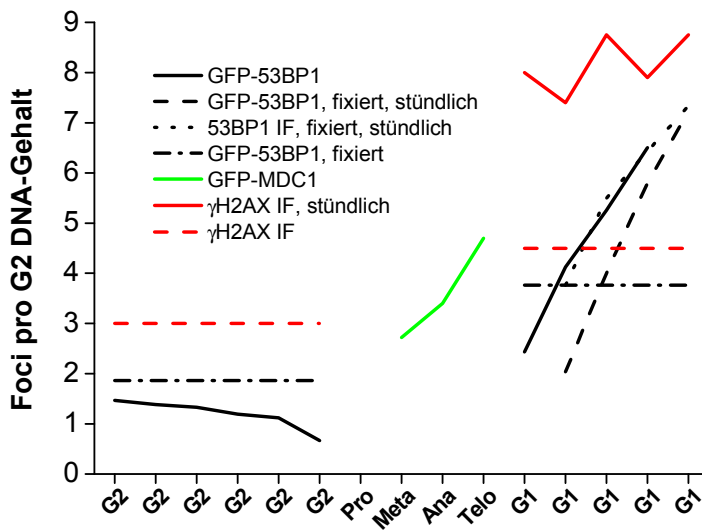


Abb. 42: Halbschematische Darstellung der Focizahlen unbestrahlter U-2 OS-Zellen. Die bei Verwendung unterschiedlicher DSB-Marker ermittelten Foci-Werte wurden zum direkten Vergleich Zellzyklusspezifisch aufgetragen. Die Daten entstammen den diversen, im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kontrollexperimenten. GFP-53BP1 aus Abb. 18. Abb. 16 GFP-53BP1, fixiert, und γ H2AX IF aus Abb. 16. 53BP1 IF, stündlich, GFP-53BP1, fixiert, stündlich und γ H2AX IF, stündlich aus Abb. 21. GFP-MDC1 aus Abb. 37. Die in G1 ermittelten Werte wurden verdoppelt, um weiterhin die Foci beider Tochterzellen darzustellen und den Anstieg über die Mitose zu verdeutlichen.

In G1 ist die Zahl der GFP-53BP1-Foci zunächst kaum erhöht, steigt aber innerhalb der ersten fünf Stunden in G1 von 2,5 auf ca. 7 Foci und damit über das Niveau der Durchschnittswerte für 53BP1 und γ H2AX in G1. Zellzyklus-spezifische Werte für GFP-53BP1-Foci aus der Lebendzellmikroskopie wurden auch in der Arbeitsgruppe um T.v. Zglinicki erhoben. Dort wurde ähnliches beobachtet: (i) 53BP1 ist während der Mitose nicht am DSB, (ii) die Zahl der Foci pro Nukleus verdoppelt sich über die Mitose und (iii) die 53BP1-Foci kehren im Laufe der frühen G1-Phase an den Bruch zurück (Nelson et al. 2009).

Wenn man über einen Vorfilm die Position von Zellen in früh G1 bestimmt, ist dieser Anstieg der Foci auch in GFP-53BP1-Signalen nach Fixierung und in immunfluoreszent gefärbten 53BP1-Signalen zu finden. Die zellzyklusspezifische Auswertung von γ H2AX-Foci in dieser Phase (γ H2AX IF) zeigt jedoch keinen Anstieg, sondern ca. 8 Foci pro Zelle ab der ersten Stunde in G1. Das γ H2AX-Signal bestätigt den hohen Foci-Level in früh G1. Mit zeitlicher Verzögerung ist dieser Level auch in den auf 53BP1 basierenden Auswertungen zu erkennen, da 53BP1 in dieser Phase erst langsam an den DSB zurückkehrt. Generell zeigte sich, dass der Mittelwert in fixierten Zellen niedriger ist als die Zellzyklus-spezifischen Daten in früh G1, da der Foci-Level im Laufe der G1-Phase allmählich wieder sinkt und weil in der IF auch G0-Zellen in die Auswertung einfließen, die als nicht zyklierende Zellen einen geringen Hintergrund aufweisen.

Während der Mitose wurden spontane Foci anhand des GFP-MDC1-Signals quantifiziert. Sie werden über die Mitose zahlreicher. Davon ausgehend, dass MDC1 jederzeit mit DSBs kolokalisiert und die tatsächliche Anzahl der Brüche in der Mitose repräsentiert, sollte die MDC1-Kurve die Kinetiken in G2 und G1 verbinden, welche die tatsächliche Zahl an DSBs in diesen Phasen darstellen. In G2 wird die GFP-53BP1-Kinetik der Wahrheit am nächsten kommen, da der Mittelwert für G2 aus fixierten Zellen den DSB-Level

am Ende von G2 überschätzt und zeitlich aufgelöste Daten aus fixierten Zellen nicht existieren. In G1 ist wahrscheinlich der hohe Level an γ H2AX-Foci wahr. Trotz vorhandener Lücken ist diese Entwicklung aus der MDC1-Kurve ablesbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die zur Verfügung stehenden Foci-Daten unbestrahlter U-2 OS-Zellen konsistent sind. Abweichungen zum γ H2AX-Signal existieren in früh G1, wurden jedoch gut charakterisiert. Der zunächst anhand von 53BP1-Foci beobachtete Anstieg in der Foci-Zahl, konnte mit γ H2AX und MDC1 als DSB-Marker bestätigt werden.

Aufgrund der langjährigen Erfahrung dieser, aber auch anderer Arbeitsgruppen in der Analyse fixierter Zellen, stellt sich die Frage, warum dieser Anstieg der Foci-Zahl über die Mitose bisher nie beachtet und diskutiert wurde. Zur Erklärung bieten sich folgende Punkte an: (i) Die Halbierung des DNA-Gehalts durch die Zellteilung kaschiert relativ hohe Mittelwerte für spontane Foci in G1, wenn sie mit den G2-Werten verglichen werden. (ii) Die Betrachtung der Mittelwerte für die jeweils gesamte G2- oder G1-Phase verzerrt die Einschätzung der Foci-Werte Ende G2 und Anfang G1. Der Großteil der DSBs in G2 hat seinen Ursprung in der S-Phase. Anfang G2 sind diese noch nicht repariert und führen zu einem hohen Mittelwert für G2, der nicht den Schadenslevel am Ende von G2 widerspiegelt. Gleiches gilt in G1: Foci-reiche, zyklisierende Zellen Anfang G1 werden mit schadensarmen Zellen am Ende von G1 oder in G0 gemittelt, sodass der Mittelwert nicht dem hohen Schadenslevel in früh G1 entspricht.

Um zu überprüfen, ob die in unbestrahlten Zellen gemachten Beobachtungen auch für bestrahlte Zellen gelten, wurden nach 1 Gy Bestrahlung gemessene Foci-Werte zusammengetragen und in einer Abbildung gegenübergestellt (Abb. 43). Die Werte stammen aus der Lebendzellmikroskopie und aus fixierten Zellen. Mit Einschränkungen ist eine Diskussion der Foci-Zahl nach 1 Gy Bestrahlung analog zu den spontanen Foci möglich. Die Einschränkung entsteht daraus, dass bei induzierten Foci nicht nur die Zellzyklusposition eine Rolle spielt, sondern auch die Reparaturzeit. Im Unterschied zu den im Ergebnisteil dieser Arbeit gezeigten Kinetiken wurden hier keine spontanen Brüche abgezogen. Um einen fairen Vergleich der Foci-Level anzustellen, wurde für γ H2AX eine klassische G2-Reparaturkinetik über 4 h mit dem Schadenslevel in der Mitose 6 h nach Bestrahlung verglichen. Es muss darauf hingewiesen werden, dass sich nicht alle in G2 ausgewerteten Zellen 6 h nach Bestrahlung in der Mitose befinden, sondern dass es sich um eine Mischpopulation aus schnell und langsam reparierenden Zellen handelt, die sich zu unterschiedlichen Zeiten nach Bestrahlung teilen. 6 h nach Bestrahlung ist der G2/M-Checkpoint jedoch für den Großteil der Zellen aufgehoben und der Zeitpunkt kann, so weit möglich, als repräsentativ betrachtet werden. Die γ H2AX-Zahlen innerhalb der Mitose stellen keine Kinetik dar, sondern sind DSB-Level in Pro-/Metaphase bzw. in Ana-/Telophase 6 h nach 1 Gy Bestrahlung, d.h. sie stellen den gleichen Reparaturpunkt dar.

Aus der Lebendzellmikroskopie sind gleich mehrere GFP-53BP1-Foci-Kinetiken aufgetragen. Die Reparaturkinetik der Populationen, die 4, 5 und 6 h nach Bestrahlung mit 1 Gy in die Prophase gelangen,

ist derart gegen die Zeit aufgetragen, dass die Mitose der drei Populationen übereinander liegt, demnach ist ihre Bestrahlung also unterschiedlich lange her. Trotzdem weisen sie Gemeinsamkeiten auf. Ihre Reparaturgeschwindigkeit unterscheidet sich zwar, doch der letzte Wert vor Mitose liegt in allen 3 Kinetiken bei ca. 8 Foci. Vergleicht man die Zahl der GFP-53BP1-Foci vor und nach Mitose liegen diese in etwa auf einem Level. Auch bei induzierten DSBs ist zu erwarten, dass 53BP1 erst im Laufe der G1-Phase am DSB akkumuliert. Dieser Effekt beeinflusst die GFP-53BP1-Kinetiken und führt zu einem Anstieg der Foci-Zahlen in den ersten Stunden in G1, sodass 3 h nach Mitose in allen Populationen mehr als 10 Foci pro G2-DNA-Gehalt zu finden sind. Dieses Niveau entspricht in etwa der Zahl an Foci 2 h vor Mitose. (Auf den letzten Wert vor Mitose wird sich hier nicht bezogen, weil er evtl. die Zahl an Brüchen unterschätzt.) Es ist in diesem Bereich also zumindest eine Stagnation der Reparatur zu beobachten, die sich über 6-7 h erstreckt. Betrachtet man das Aussetzen der Reparatur als unwahrscheinlich und nimmt an, dass ein gewisses Maß an Reparatur in der letzten G2-Stunde und auch in G1 stattgefunden haben wird, muss ein anderer Prozess zu einer Vermehrung der Foci beigetragen haben.

Für eine Vermehrung spricht auch die zeitlich hoch auflösende GFP-MDC1-Kinetik. Anhand dieses Konstruktes konnten einzelne Foci in lebenden mitotischen Zellen verfolgt und quantifiziert werden.

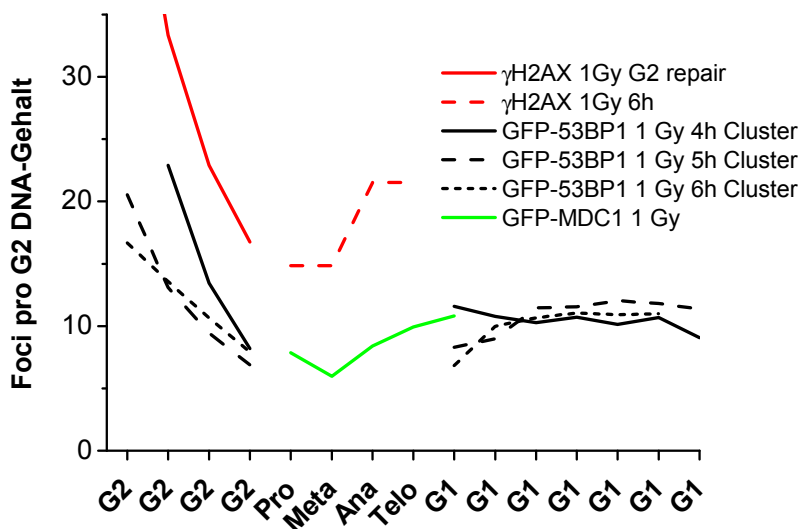


Abb. 43: Halbschematische Darstellung der Focizahlen mit 1 Gy bestrahlter U-2 OS-Zellen. Die bei Verwendung unterschiedlicher DSB-Marker ermittelten Zahlen wurden zum direkten Vergleich Zellzyklusspezifisch aufgetragen. Die Daten entstammen den diversen, im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Reparaturkinetiken. GFP-53BP1 1 Gy 4, 5 und 6 h aus Abb. 29. γ H2AX 1 Gy G2 repair aus Abb. 16. GFP-MDC1 1 Gy aus Abb. 37. γ H2AX 1 Gy 6 h wurde speziell für diese Diskussion in mitotischen Zellen gemessen.

Aufgrund der unterschiedlichen Zeiten zwischen Bestrahlung und Beginn der Aufnahme stellen die MDC1-Fociwerte keine Reparaturpunkte nach Bestrahlung dar. Während die Absolutwerte also nur bedingt aussagekräftig sind, können zellzyklusabhängige Veränderungen des Schadenslevels jedoch detektiert werden. Von der Pro- zur Metaphase nimmt die Anzahl der mitotischen Foci von ca. 8 auf 6 ab, was als Reparatur zu interpretieren ist. Mit der Anaphase steigt die Focizahl aber wieder auf 10 und ist in der im

Ansatz ausgewerteten G1-Phase bei 11 Foci. Die GFP-MDC1-Foci bestätigen also einen Anstieg der Foci-Zahl während der Mitose, der nach der Analyse der GFP-53BP1-Foci bereits zu vermuten war. Dieser Anstieg beginnt während des Metaphase/Anaphase-Übergangs.

Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben, liegt die Zahl induzierter Foci in fixierten Zellen generell über den Werten aus der Lebendzellmikroskopie. Der Induktionswert der γ H2AX-Kinetik ist zwar nicht abgebildet, die rapide Reparatur nach 1 Gy Bestrahlung in G2 wird jedoch deutlich. Nach 4 h hat die G2-Population durchschnittlich ca. 17 Foci. Etwas weniger als 15 γ H2AX-Foci weisen die Zellen in Pro- und Metaphase auf. Dieser Wert steigert sich zu Ana- und Telophase um knapp 7 Foci. In fixierten Zellen ist also das gleiche Verhalten der Foci-Kinetik wiederzufinden.

Die Untersuchung von in G2 induzierten Foci vor, in und nach der Mitose zeigt Unterschiede der verwendeten DSB-Marker, vor allem in Bezug auf die effizientere Detektion in fixierten Zellen. Ob die Absolutwerte der in der Lebendzellmikroskopie verwendeten 53BP1- und MDC1-Foci zueinander konsistent sind, kann anhand der durchgeführten Kontrollen nicht beantwortet werden, da sie sich in den Reparaturzeiten und den Aufnahmebedingungen unterscheiden. Alle Marker bestätigen jedoch den Anstieg der Foci-Zahl in der Anaphase. Wirken Reparatur und ein gegenläufiger Prozess gleichzeitig in den Zellen, ist die Anaphase der Moment, zu dem das Gleichgewicht in Richtung der Foci-Vermehrung verschoben wird.

5.3 Wechselspiel zwischen DSB-Reparatur und Zellzykluskontrolle am G2/M-Übergang

Die in der Lebendzellmikroskopie ausgewerteten GFP-53BP1-Foci ermöglichen eine sehr detaillierte Charakterisierung des Reparaturverhaltens zyklrierender Zellen in G2 und G1. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Zusammenspiel zwischen DSB-Reparatur und der Regulation des G2/M-Checkpoints zu untersuchen. Die Messung des MI in der Lebendzellmikroskopie ermöglicht die Untersuchung größerer Populationen. Darüber hinaus können einzelne Zellen verfolgt und deren individuelles Zellzyklusverhalten beobachtet werden. Durch die gleichzeitige Auswertung von GFP-53BP1-Foci in denselben Zellen kann die Analyse der DSB-Reparatur direkt mit dem Zellzyklus-Verhalten verknüpft werden.

Betrachtet man die nach 1 bzw. 2 Gy induzierten Foci, fällt die jeweils höhere Induktion in der G2-Phase gegenüber G1 auf. Gy ist die Angabe der Dosis mit den Einheiten Energie/Masse. Da G2-Zellen die doppelte Menge an DNA enthalten, wird darin auch doppelt so viel Energie deponiert und die Zahl der DSBs ist entsprechend höher (Beucher et al. 2009).

Neben der Reparatur in G2 sollte vor allem die Regulation des G2/M-Checkpoints untersucht werden. In früheren Arbeiten unserer, aber auch anderer Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass der G2/M-Checkpoint aufgehoben wird, bevor alle DSBs der G2-Population repariert wurden (Deckbar et al. 2007,

Syljuasen et al. 2006). Die Lebendzellmikroskopie wurde schon eingesetzt, um die DNA-Reparatur über lange Zeiten zu verfolgen (Asaithamby und Chen 2009, Nelson et al. 2009). Im Rahmen dieser Arbeit sollte sie erstmals im speziellen eingesetzt werden, um ein durch Deckbar et al. (2007) beschriebenes Schwellenwert-Verhalten der G2-Population zu überprüfen. Deckbar et al. (2007) haben ein mittleres Foci-Level gemessen, bei dessen Erreichen der G2/M-Checkpoint aufgehoben wird. Die Lebendzellmikroskopie ermöglicht bei einem ähnlichen Versuchsablauf die Untersuchung einzelner Zellen um zu beantworten, ob einzelne Zellen sich ebenfalls nach dem Schwellenwert verhalten. Dies würde dazu führen, dass schnell reparierende Zellen früh den Checkpoint aufheben, während eine besonders späte Mitose durch eine auffallend langsame Reparatur zustande käme. Aufgrund der aktuellen Modelle zur primären Schadensantwort und der Checkpointregulierung, ist ein Schwellenwert auf der Ebene der einzelnen Zelle zu erwarten.

Achtet man auf die Zeitpunkte, zu denen die Mehrzahl der G2-Zellen nach 1 Gy in die Mitose progressiert (Mitose 4-6 h nach Bestrahlung), ist ein Trend zur schlechteren Reparatur in den sich später teilenden Zellen zu beobachten. In der letzten Stunde vor der Mitose beinhalten diese 3 Gruppen jeweils ca. 7 Foci. Zieht man die schonenden Aufnahme-Bedingungen der Lebendzellmikroskopie in Betracht, liegt dies recht nahe an dem durch Deckbar et al. (2007) postulierten Schwellenwert (15-20 DSBs). Die Differenz hat aber noch eine weitere Ursache. Bei Deckbar et al. (2007) wurde eine Population in G2 befindlicher Zellen ausgewertet, von denen nicht genau bekannt war, wann sie sich teilen. Mit zunehmender Reparaturzeit verblieben wahrscheinlich schlecht reparierende Zellen in der ausgewerteten G2-Population, während die schnell reparierenden in die Zellteilung gingen. Im Unterschied dazu werden in der Lebendzellmikroskopie exakt die Zellen ausgewertet, die sich auch anschließend teilen.

Nach 2 Gy lässt sich so ein klarer Zusammenhang zwischen Reparaturgeschwindigkeit und Zeitpunkt der Mitose nicht finden. So zeigt die Gruppe, die sich bereits 5 h nach Bestrahlung teilt, eine besonders schlechte Reparatur, und die Gruppe, die sich 7 h nach Bestrahlung teilt, repariert schneller als die Gruppe, die sich 6 h nach Bestrahlung teilt. Über die genaue Ursache lässt sich nur spekulieren. Aus den Versuchen zum MI nach Zugabe von Aphidicolin ist bekannt, dass der Anstieg des MI nach 6 h sowohl durch in G2- als auch durch in S-Phase bestrahlte Zellen zustande kommt. Bei nicht abgeschlossener Replikation werden in S zunächst weniger DSB induziert. Werden geschädigte Bereiche jedoch repliziert, können durch vorhandene Basenschäden, SSBs und DSBs replikationsassoziierte DSBs entstehen, die bevorzugt über HR repariert werden (Arnaudeau et al. 2001, Nikolova et al. 2010). Die HR ist ein langsamerer Reparaturprozess, bei dem das Signalling hin zu den Checkpointkinasen über ATR funktioniert (Warmerdam und Kanaar 2010). Das ATR Signalling könnte mehr oder weniger Effizient als das ATM-Signalling sein und somit anders auf die Checkpointaktivierung wirken. Die Durchmischung von in S-Phase und G2-Phase bestrahlten Zellen schränkt somit die Aussagen über die Koordination zwischen DSB-Reparatur und G2/M-Checkpoint-Regulation ein.

Die Lebendzellmikroskopie erlaubt es, die in G2 bestrahlten Zellen über die Mitose hinaus zu verfolgen und ihre DSB-Reparatur in G1 zu untersuchen. Analog zu der in G1 geringeren Induktion von DSBs ist auch zu erwarten, dass die Zahl an DSBs pro Zelle nach der Zellteilung halbiert wird, da sich das geschädigte Chromatin auf zwei Zellen aufteilt. Wertet man 10 h nach 1 und 2 Gy die verbliebenen Foci in G1 aus zeigen die Zellen, die während oder kurz vor der Mitose bestrahlt wurden, die höchsten Foci-Level. Zellpopulationen, die 3-6 h Zeit zur Reparatur in G2 hatten haben, weisen später in G1 weniger Foci auf. In den noch späteren Populationen (6-7 h Reparatur vor der Zellteilung), haben die Zellen, zumindest in der 1 Gy-Kinetik, wieder höhere Foci-Zahlen in G1. Der höhere Schaden in sich spät teilenden Populationen mag durch die Vermengung von in G2 und in S-Phase bestrahlten Zellen zustande kommen.

Vergleicht man die Reparatur der in G2 bestrahlten Zellen mit der Reparatur von in G1 bestrahlten Zellen, ist zu späteren Zeiten ein deutlicher Unterschied in G1 zu sehen. Zu späten Zeiten, 9 oder 10 h nach Bestrahlung, befinden sich alle untersuchten Populationen in G1. Die ermittelten Foci-Werte sind also direkt vergleichbar, eine Über- oder Unterschätzung der Focizahl aufgrund der Foci-Dichte oder der Signalqualität sollte hier keine Rolle spielen. Haben die Zellen sich bei Bestrahlung in G2 aufgehalten, weisen sie später in G1 eine ca. doppelt so hohe Zahl an DSBs auf wie G1-bestrahlte Zellen.

Weitere indirekte Hinweise lieferten auch Untersuchungen zur Regulation des G1/S-Checkpoints. So wurde gezeigt, dass in G2 mit 1 Gy bestrahlte Zellen auch 36 h später noch in G1 arretierten (Deckbar et al. 2010). Trotz dieser langen Reparaturzeit zeigten diese G1 Zellen immer noch einen erhöhten Foci-Level. In einer anderen Arbeit wurde über klassische Foci-Reparaturkinetiken die G1-Reparatur von Zellen verglichen, die in G2 oder G1 bestrahlt wurden. G2-Zellen, die mit DSBs durch die Zellteilung gegangen waren, zeigten eine deutlich langsamere Reparatur in G1 als G1-bestrahlte Zellen (persönliche Mitteilung Dr. Andrea Krempler).

Als Ursache für diese hohe Zahl unrepariert verbleibender DSBs sowie das von Deckbar et al. (2010) beobachtete Checkpoint-Verhalten ist das Durchwandern der Mitose anzunehmen. Die Resektion der DSBs in G2 reicht als Ursache für die schlechte Reparatur in G1 nicht aus, da in der Lebendzellmikroskopie beobachtet wurde, dass zusätzliche Foci in bestrahlten und unbestrahlten Zellen entstehen, sobald sie die Anaphase erreichen. Zusammen ließen die Ergebnisse darauf schließen, dass DSBs während der Mitose nicht einfach auf die Tochterzellen verteilt werden und unrepariert verbleiben, sondern dass es zur Entstehung zusätzlicher DSBs oder Strukturen kommt, die in G1 schlechter repariert werden.

5.4 Anaphase-Brücken in G2-bestrahlten Zellen

Die Ergebnisse aus der Lebendzellmikroskopie der GFP-53BP1-Foci zeigten eine schlechtere Reparatur in den Zellen auf, die in G2 bestrahlt wurden, anschließend eine Zellteilung durchführten und verbliebene Brüche in G1 reparierten, als in Zellen, die in G1 bestrahlt wurden. Die Analyse der spontanen GFP-53BP1-

Foci und auch der Schadenslevel in bestrahlten Zellen in G2 und G1 wiesen auf einen Prozess hin, der entweder eine Reparatur während der Mitose und über mehrere Stunden verhindert, oder aber zu zusätzlichen Foci in den sich teilenden Zellen führt. Die Mitose stellte einen „blinden Fleck“ in der GFP-53BP1-Analyse dar, da 53BP1 während der Mitose nicht am Bruch ist. Unter Verwendung des GFP-MDC1-Markers wurden sowohl spontane als auch induzierte Foci in der Mitose quantifiziert, um einen detaillierten Verlauf der mitotischen DSB-Reparatur zu erhalten. Der in der frühen G1-Phase höhere Foci-Level unbestrahlter Zellen ist auf die Anaphase zurückzuführen. Offenbar entstehen in der Ana- und evtl. frühen Telophase DSBs, und die erwartete Halbierung der pro Nukleus zu findenden DSBs bleibt aus. In gleicher Weise nimmt die Foci-Zahl G2-bestrahlter Zellen zu, die 2-5 h nach Bestrahlung in die Mitose progressieren.

In der Anaphase findet die Aufteilung der Chromatiden auf die beiden Tochterzellen statt, sodass vermutet wurde, dass diese Trennung der Chromatiden zur Entstehung von DSBs führt. Es sind Komplikationen bekannt, die während der Meta- und Anaphase auftreten und zu Anaphase-Brücken führen. Anaphase-Brücken sind DNA-haltige Strukturen, welche Brücken-artig die sich trennenden Chromatid-Gruppen verbinden. Die Ausbildung von Anaphase-Brücken kommt in Tumor-Zellen häufiger als in nicht entarteten Zellen vor und wird sogar als diagnostischer Marker für Entartung ausgewertet. Oftmals brechen Anaphase-Brücken im Zuge der Zellteilung, was zu schweren Schäden und chromosomalen Aberrationen führt (Gisselsson et al. 2001, Hoffelder et al. 2004). Der Mechanismus *breakage-fusion-bridge* wird als „Motor“ der Tumorprogression gesehen, indem er die genetische Heterogenität im Tumor steigert. Anaphase-Brücken werden sowohl auf fehlerhaftes NHEJ und dizentrische Chromosomen zurückgeführt als auch auf replikativen Stress, fehlerhafter HR und *entanglements* (Chan et al. 2007, Gisselsson et al. 2000).

Um zu untersuchen, ob Bestrahlung und Reparatur in G2 Anaphase-Brücken induzieren können und somit zur Entstehung von Foci in früh G1 beitragen, wurden Zellen in G2 bestrahlt und 4-8 h später auf Anaphase-Brücken untersucht. Tatsächlich erhöhte sich der Anaphase-Brücken-Index (ABI, Anzahl der Brücken pro Anaphase) von $\sim 0,1$ auf $\sim 0,4$, wenn die Analyse zu Zeiten der Checkpointaufhebung stattfand. Dies unterstützt die These, dass nach Bestrahlung in G2 zusätzliche DSBs in der Anaphase entstehen. Ob diese DSBs tatsächlich auf reißende Anaphase-Brücken zurückzuführen sind, kann man nur schwer mikroskopisch untersuchen, da die Prozesse der Chromatid-Aufteilung während der Anaphase sehr schnell ablaufen. Es wäre eine Verfolgung einzelner GFP-MDC1-Foci nötig, um eine evtl. Verdoppelung zu beobachten. Dies wurde versucht, war aber mit den gegebenen Mikroskopie-Techniken nicht möglich. Daher wurde eine mathematische Analyse gewählt, um den Mechanismus der Verteilung mitotischer Foci auf die Tochterzellen näher zu charakterisieren.

5.5 Korrelierte Foci-Paare in Tochterzellen

Um die Entstehung von Foci während der Anaphase genauer zu untersuchen, wurde ein mathematisches Verfahren gewählt. Dazu wurden zunächst einige Überlegungen angestellt. Sollten die in G1 beobachteten DSBs aus Anaphase-Brücken entstehen, die während der Zellteilung reißen, wäre pro Brücke je ein Focus pro Tochterzelle zu erwarten. Entständen alle Foci in G1 aus Anaphase-Brücken, wäre zu erwarten, dass zusammengehörende Tochterzellen immer exakt gleich viele Foci enthalten. Existiert dieser Mechanismus nicht und DSBs werden in der Mitose lediglich zufällig auf die Tochterzellen verteilt, entspräche dies einem Bernoulli-Prozess mit den gemäß Häufigkeitsverteilung zu erwartenden Foci-Differenzen zwischen den Tochterzellen.

Die Ebenmäßigkeit der Verteilung der Foci auf die Tochterzellen gibt also Auskunft über den zugrundeliegenden Mechanismus. In einem Bernoulli-Prozess streuen die Ergebnisse um einen Mittelwert. 8 Foci ($n=8$) werden also nicht immer 4/4 aufgeteilt, sondern auch mal 3/5 und ganz selten 8/0. Bei einer genügend großen Anzahl von Versuchen erhalten aber beide Tochterzellen (z.B. rechte und linke Zelle) die gleiche Anzahl an Foci, und der Erwartungswert ist somit 4/4. Rechnet man jedoch mit dem Betrag der Abweichung von der Gleichverteilung, unterscheidet also nicht zwischen 3/5 und 5/3, existiert eine zu erwartende Abweichung von der Gleichverteilung. Je mehr Foci (n) zu verteilen sind, desto größer ist die zu erwartende Abweichung von der Gleichverteilung. (bei $n=5$ beträgt die zu erwartende Abweichung 1,88 Foci, bei $n=40$ ist die zu erwartende Abweichung 5 Foci). Um zu beurteilen, ob die Differenz der Foci zwischen zwei Tochterzellen groß oder klein ist wurde sie mit dem Erwartungswert für die Verteilung von n Foci verglichen. Die Differenz zwischen erwarteter Abweichung von der Gleichverteilung und gezählter Foci-Differenz wurde jeweils über die Standardabweichung der erwarteten Verteilung normalisiert, um einen Z-Wert zu erhalten. Der Z-Wert ist ein dimensionsloser Wert, der den Abstand zwischen Erwartungswert und Messwert in Standardeinheiten angibt.

$$\text{Z-Wert} = \frac{\text{FociDifferenz} - \text{erwartete Abweichung von der Gleichverteilung}}{\text{Standardabweichung der erwarteten Verteilung nach Bernoulli}}$$

Der Z-Wert hat den Vorteil, dass man die Abweichung vom Erwartungswert in mehreren Zellen messen und dann arithmetisch mitteln kann, obwohl die Telophase-Zellen unterschiedlich viele Foci (n) enthalten. Der mittlere Z-Wert wurde in Telophasen ausgewertet, einer Phase, in der die Schwesterzellen einander noch klar zuzuordnen sind. Zunächst wurden GFP-MDC1-Foci aus der Lebendzellmikroskopie mitotischer Zellen ausgewertet. Für die Mehrzahl der Zellen ergab sich ein negativer Z-Wert, was einer geringen Foci-Differenz entspricht. Um die Analyse in einer großen Zahl von Zellen durchzuführen, wurden weiterhin fixierte Telophasen nach γ H2AX-Färbung ausgewertet. Dabei stellte sich heraus, dass zuvor in G2 bestrahlte Telophasen eine geringere Foci-Differenz aufwiesen als bei einer Foci-Verteilung nach Bernoulli

zu erwarten wäre. Ein Teil der in der Telophase vorliegenden DSBs ist also aus einem Prozess entstanden, der Schäden paarweise auf die Tochterzellen verteilt.

Auch in unbestrahlten Zellen wurde beobachtet, dass ein kleiner Anteil der Foci koordiniert verteilt wurde. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der Beobachtung, dass auch in unbestrahlten U-2 OS-Zellen Anaphase-Brücken zu finden sind und zusätzliche Foci in der frühen G1-Phase auftreten.

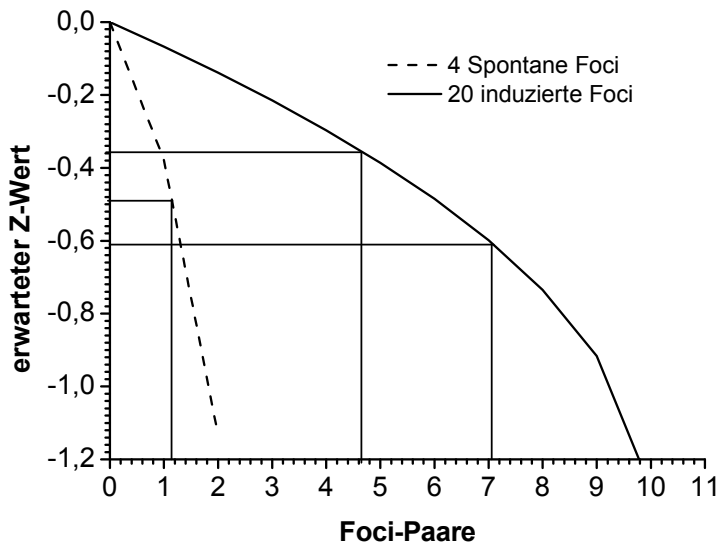


Abb. 44: Auftragung von Foci-Paaren gegen den zu erwartenden Z-Wert. Für jedes n (Anzahl der Foci) ergibt sich ein eigener Zusammenhang. Die gemessenen Z-Werte sind eingetragen um die Zahl der enthaltenen Foci-Paare abschätzen zu können.

Neben der qualitativen Aussage, dass Foci mehr oder weniger koordiniert auf Tochterzellen verteilt wurden lässt der Z-Wert auch quantitative Aussagen zu. Im Schnitt wurden nach 4 h Reparatur 20 Foci pro Telophase gezählt. Anhand des Z-Werts lässt sich der Anteil koordiniert verteilter Foci errechnen. Abb. 44 zeigt den Z-Wert als Funktion der Anzahl von Foci-Paaren. Für die beiden Fälle von 4 spontanen Foci bzw. 20 induzierten Foci sind unterschiedliche Kurven abgebildet. Die in den Messungen gefundenen Werte sind auf die Achsen projiziert. Die 4 pro Telophase gefundenen spontanen Foci enthalten etwas mehr als ein Foci-Paar, sind also zu mehr als 50% koordiniert verteilt. Die kurz reparierenden Zellen enthalten 20 Foci und der Z-Wert übersetzt sich in 4,6 Foci-Paare, 9 von 20 Foci wurden also koordiniert verteilt. Der niedrigste Z-Wert der lange reparierenden Zellen übersetzt sich in 7 Foci-Paare, 14 von 20 Foci entsprechen 70% koordiniert verteilten Foci. Diese Analyse unterscheidet nicht zwischen Koordination durch NHEJ oder HR, sie basiert auf den Z-Werten, die lediglich die gefundene Foci-Differenz zwischen Schwesterzellen interpretieren.

Diese Zahlen belegen, von welcher Bedeutung der beobachtete Effekt für den Foci-Level in G1 ist.

Die bisherigen Ergebnisse stellten recht eindeutig einen Zusammenhang zwischen einer Bestrahlung in G2, dem Auftreten von Anaphase-Brücken und zusätzlichen DSBs in früh G1 her. Offen bleibt jedoch die Frage,

auf welchem Wege aus DSBs in G2 Anaphase-Brücken entstehen. Die induzierten DSBs können ja nicht zu Anaphase-Brücken führen. In Veröffentlichungen zu diesem Thema wird immer wieder die Reparatur von DSBs für die Entstehung von Anaphase-Brücken verantwortlich gemacht. Dabei wurden sowohl Mechanismen auf Grundlage des NHEJ als auch auf Grundlage der HR beschrieben (Chan et al. 2007, Gisselsson et al. 2001, Pihan und Doxsey 2003).

5.6 Beiträge von NHEJ und HR zur Ausbildung von Anaphase-Brücken

Das mathematische Verfahren lieferte Hinweise, dass in G2 stattfindende Reparatur Strukturen erzeugt, die in der Mitose zu paarig verteilten DSBs führen. So konnte gezeigt werden, dass die Bestrahlung in G2 Anaphase-Brücken induziert, und dass diese Brücken während der Mitose reißen und schwere chromosomale Aberrationen verursachen (Gisselsson et al. 2000). Anaphase-Brücken können auf unterschiedliche Arten entstehen. Einerseits kann Fehlreparatur im Zuge der NHEJ zu dizentrischen Chromosomen führen und darüber zu Brücken (Gisselsson et al. 2001, Pihan und Doxsey 2003), andererseits ist die Reparatur replikations-assoziierteter DSBs über HR ebenfalls in der Lage, Brücken zu verursachen (Chan et al. 2007, Chan et al. 2009, Cheok et al. 2005).

Im Zuge des NHEJ entstehen Anaphase-Brücken durch Fehlreparatur, also aus falsch abgeschlossenen Reparaturereignissen. Die Zellen, die in der Mitose Brücken entwickeln, haben aber auch schon zuvor Foci, und damit aktive Reparaturereignisse. NHEJ basierte Anaphase-Brücken würden also nicht aus den sichtbaren Foci entstehen. Dies ist zwar möglich, erscheint aber nicht wahrscheinlich.

Anders verhält es sich mit der Entstehung neuer Foci in unbestrahlten U-2 OS-GFP-53BP1-Zellen in früh G1. Der dort mit GFP-53BP1 beobachtete hohe Schadenslevel in G1 stellt mehr als eine Verdoppelung der zuvor in G2 zu beobachtenden Foci-Zahl dar. Damit wäre zu vermuten, dass ein Teil der neuen Foci entweder aus *entanglements* entstand, oder aus dizentrischen Chromosomen. Beide Strukturen wären in G2 nicht als Fokus sichtbar. Dies wären Prozesse, bei denen *de novo* Foci entstehen, während beim Modell über die HR ein in G2 nicht abgeschlossener Reparaturprozess als Fokus sichtbar in die Mitose wandert und während der Anaphase verdoppelt wird. Vermutlich wird die Mehrzahl der Brücken in unbestrahlten Zellen aus *entanglements* entstehen, da die S-Phase die größte Quelle spontaner Schäden im Zellzyklus darstellt.

In G2 erfolgt die Reparatur von mind. 15-20% der DSBs über HR (Beucher et al. 2009). Da die HR die langsame Reparaturkomponente in G2 darstellt, sind die nach einigen h verbleibenden DSBs vornehmlich die über HR reparierten. Bereits 2 h nach 2 Gy liegen über 50% der DSBs in G2 resektiert vor (Conrad et al. 2011). Beucher et al. konnten 2009 in mehreren Zelllinien zeigen, dass 6-8 h nach Bestrahlung 40-50% der DSBs positiv für RAD51 sind. In welcher Phase der HR die RAD51-positiven Brüche, ist unbekannt, da bis

heute nicht endgültig geklärt ist, wann RAD51 sich während der HR-Reparatur ablöst. RAD51-positive DSBs können also vor oder nach der Strang-Invasion stehen, dem wahrscheinlich kritischen Ereignis zur Entstehung einer Anaphase-Brücke. Weitere, RAD51 negative DSBs, werden evtl. ebenfalls über HR repariert, aber weiter fortgeschritten im Reparaturprozess, sodass RAD51 bereits nicht mehr am Bruch ist. Zu Zeiten zu denen der G2/M-Checkpoint aufgehoben wird, werden viele der in G2 vorliegenden DSBs über HR repariert. Somit ist die Entstehung von Anaphase-Brücken aus HR-Intermediaten durchaus möglich.

Bei der Messung der koordinierten Verteilung von Foci wurde die größte Koordination nach 4 h Reparatur in G2 gemessen. Die Z-Werte wurden auch für die Foci-Verteilung nach 30 min Reparatur berechnet. Interessanterweise korrelierte der Z-Wert mit dem Anteil der über HR reparierten DSBs. Zu frühen Zeiten, zu denen kaum Resektion und somit auch keine Strang-Invasion beobachtet wird, waren die Foci etwa in dem Maße koordiniert verteilt, wie es auch in unbestrahlten Zellen zu beobachten ist. Hatten die Zellen jedoch 4 h Zeit zur Reparatur, erhöhte sich die Zahl der über HR reparierten Brüche zusammen mit der Koordination der Foci-Verteilung zwischen den Schwesterzellen. Eine stark koordinierte Verteilung der Foci in der Mitose war also nur zu finden, wenn auch Reparatur über HR möglich war.

Um die Rolle der HR in der Entstehung von Anaphase-Brücken zu überprüfen, wurde ein Faktor inhibiert, der an der Initiierung der HR beteiligt ist. Durch die Inhibierung von ATM konnte die Zahl der über HR reparierten Brüche in G2 verringert werden. Die stark koordinierte Verteilung von Foci 6 h nach Bestrahlung konnte durch ATM-Inhibition verringert werden. Das Maß an Koordination konnte zwar nicht auf den Level unbestrahlter Zellen gesenkt werden, jedoch war die Inhibition der HR auch nicht perfekt. Die Zahl der RAD51-Foci wurde durch ATMi von ca. 15 auf ca. 6 dezimiert. Es war also nicht davon auszugehen, dass die HR komplett verhindert wurde, sondern lediglich in verringertem Maße stattfand.

Die Induktion von Anaphase-Brücken 6 h nach Bestrahlung konnte durch den Einsatz von ATMi um 1/3 reduziert werden. Dass die Induktion der Anaphase-Brücken nicht komplett unterbunden wurde, kann ebenfalls an der unvollständigen Inhibition der HR durch ATMi liegen.

Die Ausbildung von Anaphase-Brücken, wie auch die koordinierte Verteilung mitotischer Foci ist also von in G2 stattfindender HR abhängig. Die große Zahl nach ATMi-Behandlung verbleibender Brücken, bzw. die nach ATMi-Behandlung verbleibende Koordination der Foci-Verteilung in der Mitose könnte auch ein Hinweis darauf sein, dass die HR in G2 nicht allein für die Brücken verantwortlich ist. Zusätzlich zu den induzierten Foci führt ein Teil der spontanen Brüche über *entanglements* zu Brücken. Fehlreparatur über NHEJ kann auch seinen Beitrag zum ABI leisten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Experimente mit ATM-Inhibitor den Verdacht auf eine Beteiligung der HR an der Entstehung von Anaphase-Brücken und zusätzlichen Foci in G1 bekräftigen konnten.

Der Bedeutung von NHEJ und HR für Entstehung von Anaphase-Brücken widmete sich die Arbeitsgruppe um W.S. Saunders (Acilan et al. 2007). Der *knockdown* von NHEJ-Komponenten (Ku80 und XRCC4) über siRNA führte zu einem Anstieg im ABI nach Bestrahlung. Daraus schließen die Autoren, dass ein aktives NHEJ der Entstehung von Anaphase-Brücken entgegenwirkt. Unterstützend dazu wird die Untersuchung mehrerer Tumorzelllinien beschrieben. Die NHEJ-Aktivität der einzelnen Zelllinien wurde über einen Ligations-Assay bestimmt und gegen den ABI der bestrahlten Zelllinien aufgetragen. Tendenziell zeigten Zellen ohne NHEJ einen hohen ABI, ohne NHEJ entstehen also Anaphase-Brücken. Dieses Ergebnis könnte man dahingehend interpretieren, dass bei fehlendem NHEJ die DSBs in S- und G2-Phase vermehrt über HR repariert werden. Diese HR-Ereignisse führten wiederum zur Entstehung von Anaphase-Brücken, wie es in dieser Arbeit für DSBs in G2 gezeigt wurde. Ein Bericht von M. Jasin stellt diese These eher in Frage (Lieber 2010, Simsek und Jasin 2010). Ihren Ergebnissen nach führt ein nicht funktionelles NHEJ zu einem CtIP-vermitteltem alternativen NHEJ, welches sich wiederum durch erhöhte Translokationsraten auszeichnet. Translokationen führen wiederum zu dizentrischen Chromosomen, womit eine Erklärung für einen erhöhten ABI nach NHEJ-Ausfall gegeben wäre, die keine HR benötigt. Auch in unserer Arbeitsgruppe konnten nie Anzeichen dafür gefunden werden, dass bei Ausfall von NHEJ-Faktoren in G2 vermehrt HR stattfindet (Beucher et al. 2009). Somit ist der Ausfall von NHEJ wahrscheinlich keine Quelle zusätzlicher über HR entstehender Anaphase-Brücken.

Weiter können Acilan et al. nicht direkt die Rolle der HR für die Entstehung von Anaphase-Brücken belegen. Zelllinien, die einen Defekt in Komponenten des HR-Weges aufweisen (RAD54- XRCC3- und RAD51C-Mutanten), zeigten keinen niedrigeren ABI im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp. Dieses Ergebnis scheint den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zu widersprechen. Bedenkt man jedoch, dass die Experimente von Acilan et al. nicht Zellzyklus-spezifisch waren, ist der fehlende Effekt der HR-Defizienz erklärbar. Der ABI wurde 24 h nach 1,8 bzw. 3 Gy γ -Bestrahlung ermittelt. Die nach 24 h ausgewerteten Zellen können ihre Schädigung in jeder Zellzyklus-Phase erhalten haben. In der S-Phase hat das Wegfallen des Haupt-Reparaturweges fatale Folgen, und es stellt sich die Frage, ob die Zellen die 24 h bis zur Auswertung überleben. In G2 bestrahlte Zellen könnten innerhalb von 24 h den Zellzyklus durchlaufen und wieder in der Mitose sein. Es wäre aber auch möglich, dass sie nicht in der Auswertung enthalten sind, da sie am G1/S-Checkpoint aufgehalten werden. Gelangen sie z.B. aufgrund einer Checkpoint-Defizienz trotzdem in die S-Phase, sollten wahrscheinlich persistierende DSBs zu Problemen in der Replikation führen. In G1 sollte das Fehlen HR-spezifischer Faktoren keinen Effekt zeigen. In Abwesenheit von HR wertet man 24 h nach Bestrahlung wahrscheinlich hauptsächlich in G1 bestrahlte Zellen aus, wodurch die Aussagekraft des Versuches bzgl. der Wirkung der HR auf die Ausbildung von Anaphase-Brücken eingeschränkt ist. Speziell zur Untersuchung der Rolle der HR in G2 muss die Messung nach kürzeren Zeiten erfolgen, zu Zeiten zu denen die HR bereits initiiert werden konnte und die in G2 bestrahlten Zellen das erste Mal die Mitose durchlaufen. So wurde es in der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

Durch Verwendung eines ATM-Inhibitors konnte die Wirkung der HR-Defizienz spezifisch in G2-Zellen untersucht werden. Darüber hinaus macht die ATMi-Behandlung auch den Wechsel des Reparaturweges hin zum NHEJ oder alternativen NHEJ unmöglich, da in G2 vor Allem heterochromatische DSBs über HR repariert werden (Beucher et al. 2009, Goodarzi et al. 2008). Vor der Reparatur eines heterochromatischen DSBs über das NHEJ wird ATM zur Öffnung des Heterochromatins benötigt (Noon et al. 2010). Die Inhibierung von ATM verhindert somit auch eine evtl. vermehrte Entstehung von Anaphase-Brücken über NHEJ oder alternatives NHEJ. Der Einfluss der heterochromatischen DSBs auf den ABI ist nach einer ATM-Inhibition vollständig aufgehoben.

Tatsächlich wurden auch im Rahmen dieser Arbeit Versuche zum ABI nach Transfektion mit verschiedenen siRNAs gegen HR-Faktoren durchgeführt. Die Depletion von RAD51 oder CtIP hatte jedoch immer Auswirkungen auf die HR im gesamten Zellzyklus und besonders auf S-Phase-Zellen auch ohne Bestrahlung. Dieser Zustand schon Tage vor der Bestrahlung führte dazu, dass die Zellen eine hohe Zahl spontaner Brüche akkumuliert hatten. Die fehlende HR führte wahrscheinlich weiter dazu, dass vermehrt heterochromatische DSBs über NHEJ-Wege repariert wurden, welche wiederum Translokationen und Anaphase-Brücken zur Folge hatten. HR-assoziierte Brücken wurden also durch NHEJ-assoziierte Brücken ersetzt. In der Folge wurden nach diesen siRNA-Transfektionen und Bestrahlung in G2 keine reproduzierbaren Effekte auf den ABI oder die Reparatur in G1 gemessen und die Resultate auch nicht in den Ergebnisteil übernommen.

5.7 Ausblick

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde die Lebendzellmikroskopie etabliert und zur Untersuchung der DNA-Reparatur und der Zellzyklusregulation eingesetzt. Es wurde beobachtet, dass die unvollständige Reparatur von in G2 induzierten DSBs zu vielen, schlecht reparierbaren DSBs in G1-Zellen führt. Des Weiteren konnte die Entstehung von DSBs in G1 auf in der Mitose reißende Anaphase-Brücken zurückgeführt werden.

In der Mitose wäre der Einsatz hochauflösender und schneller Mikroskopie nötig, um die Verteilung der Foci während der Anaphase zu beobachten, und somit z.B. die Frage zu klären, ob und nach welchen Bedingungen Foci neu entstehen oder sich verdoppeln. In G1 ist die Analyse der entstandenen Foci interessant. Dazu wären die Fragen nach der Reparierbarkeit bzw. dem Reparaturzeitpunkt dieser DSBs zu klären. Damit einhergehend wäre wahrscheinlich auch das weitere Zellzyklus-Verhalten dieser G2-bestrahlten Zellen zu klären.

Die HR in der G2-Phase trägt zur Ausbildung von Anaphase-Brücken und auch koordiniert verteilter Foci in der Anaphase bei. Zur weiteren Analyse der Beiträge unterschiedlicher Reparaturwege zur Entstehung von Anaphase-Brücken könnten unterschiedliche Komponenten des NHEJ und der HR durch Inhibition bzw.

Depletion ausgeschaltet werden, um die Effekte in der Mitose zu studieren. Auch der Einsatz eines anderen schädigenden Agens könnte von Vorteil sein, um die zugrundeliegenden Mechanismen zu verstehen.

Aus G2 in die Mitose gelangende DSBs und daraus entstehende *breakage-fusion-bridge*-Zyklen stellen eine ernste Bedrohung der genomischen Integrität dar und leisten somit evtl. einen wichtigen Beitrag zur Kanzerogenese. Darüber hinaus sind *breakage-fusion-bridge*-Zyklen als Mechanismus beschrieben, der die genetische Variabilität einer Tumor-Zelllinie erhöht und damit ihre Fähigkeit zu metastasieren (Gisselsson et al. 2001). Daher könnte die Klärung der noch offenen Fragen dazu beitragen Eigenschaften und Fähigkeiten von entarteten Zellen zu verstehen und strahlen- bzw. chemotherapeutische Ansätze zu entwickeln oder zu verbessern.

6 Literaturverzeichnis

- Acilan C, Potter DM, Saunders WS. 2007.** DNA repair pathways involved in anaphase bridge formation. *Genes Chromosomes Cancer* 46: 522-531.
- Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP. 2006.** XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* 124: 301-313.
- Arnaudeau C, Lundin C, Helleday T. 2001.** DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells. *J Mol Biol* 307: 1235-1245.
- Asaithamby A, Chen DJ. 2009.** Cellular responses to DNA double-strand breaks after low-dose gamma-irradiation. *Nucleic Acids Res* 37: 3912-3923.
- Bakkenist CJ, Kastan MB. 2003.** DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421: 499-506.
- Banin S, et al. 1998.** Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 281: 1674-1677.
- Bartek J, Lukas J. 2001.** Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 13: 738-747.
- Bartek J, Lukas C, Lukas J. 2004.** Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 792-804.
- Bekker-Jensen S, Lukas C, Melander F, Bartek J, Lukas J. 2005.** Dynamic assembly and sustained retention of 53BP1 at the sites of DNA damage are controlled by Mdc1/NFBD1. *J Cell Biol* 170: 201-211.
- Bekker-Jensen S, Lukas C, Kitagawa R, Melander F, Kastan MB, Bartek J, Lukas J. 2006.** Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J Cell Biol* 173: 195-206.
- Bekker-Jensen S, Rendtlew Danielsen J, Fugger K, Gromova I, Nerstedt A, Lukas C, Bartek J, Lukas J, Mailand N. 2010.** HERC2 coordinates ubiquitin-dependent assembly of DNA repair factors on damaged chromosomes. *Nat Cell Biol* 12: 80-86; sup pp 81-12.
- Bernas T, Zarebski M, Dobrucki JW, Cook PR. 2004.** Minimizing photobleaching during confocal microscopy of fluorescent probes bound to chromatin: role of anoxia and photon flux. *J Microsc* 215: 281-296.
- Beucher A, Birraux J, Tchouandong L, Barton O, Shibata A, Conrad S, Goodarzi AA, Krempler A, Jeggo PA, Lobrich M. 2009.** ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *EMBO J* 28: 3413-3427.
- Boonstra J. 2003.** Progression through the G1-phase of the on-going cell cycle. *J Cell Biochem* 90: 244-252.
- Bunting SF, et al. 2010.** 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* 141: 243-254.
- Busino L, Chiesa M, Draetta GF, Donzelli M. 2004.** Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. *Oncogene* 23: 2050-2056.
- Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B. 1998.** Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 392: 300-303.
- Campbell NA, Reece JB. 2009.** *Biology*. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.
- Celeste A, et al. 2002.** Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296: 922-927.
- Chan KL, North PS, Hickson ID. 2007.** BLM is required for faithful chromosome segregation and its localization defines a class of ultrafine anaphase bridges. *EMBO J* 26: 3397-3409.
- Chan KL, Palma-Pallag T, Ying S, Hickson ID. 2009.** Replication stress induces sister-chromatid bridging at fragile site loci in mitosis. *Nat Cell Biol* 11: 753-760.
- Chen TR, Hay RJ, Macy ML. 1983.** Intercellular karyotypic similarity in near-diploid cell lines of human tumor origins. *Cancer Genet Cytogenet* 10: 351-362.

- Cheok CF, Bachrati CZ, Chan KL, Ralf C, Wu L, Hickson ID. 2005.** Roles of the Bloom's syndrome helicase in the maintenance of genome stability. *Biochem Soc Trans* 33: 1456-1459.
- Clarke DJ, Gimenez-Abian JF. 2000.** Checkpoints controlling mitosis. *Bioessays* 22: 351-363.
- Conrad S, Kunzel J, Lobrich M. 2011.** Sister chromatid exchanges occur in G2-irradiated cells. *Cell Cycle* 10: 222-228.
- Deckbar D, Birraux J, Krempler A, Tchouandong L, Beucher A, Walker S, Stiff T, Jeggo P, Lobrich M. 2007.** Chromosome breakage after G2 checkpoint release. *J Cell Biol* 176: 749-755.
- Deckbar D, Stiff T, Koch B, Reis C, Lobrich M, Jeggo PA. 2010.** The limitations of the G1-S checkpoint. *Cancer Res* 70: 4412-4421.
- Denhardt DT, Edwards DR, Parfett CL. 1986.** Gene expression during the mammalian cell cycle. *Biochim Biophys Acta* 865: 83-125.
- Denk W, Strickler JH, Webb WW. 1990.** Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248: 73-76.
- Dinant C, Luijsterburg MS, Hofer T, von Bornstaedt G, Vermeulen W, Houtsmuller AB, van Driel R. 2009.** Assembly of multiprotein complexes that control genome function. *J Cell Biol* 185: 21-26.
- Dixit R, Cyr R. 2003.** Cell damage and reactive oxygen species production induced by fluorescence microscopy: effect on mitosis and guidelines for non-invasive fluorescence microscopy. *Plant J* 36: 280-290.
- Doil C, et al. 2009.** RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell* 136: 435-446.
- Donzelli M, Draetta GF. 2003.** Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep* 4: 671-677.
- Dulic V, Stein GH, Far DF, Reed SI. 1998.** Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition. *Mol Cell Biol* 18: 546-557.
- Eppink B, Wyman C, Kanaar R. 2006.** Multiple interlinked mechanisms to circumvent DNA replication roadblocks. *Exp Cell Res* 312: 2660-2665.
- Essers J, Theil AF, Baldeyron C, van Cappellen WA, Houtsmuller AB, Kanaar R, Vermeulen W. 2005.** Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Mol Cell Biol* 25: 9350-9359.
- Falck J, Petrini JH, Williams BR, Lukas J, Bartek J. 2002.** The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat Genet* 30: 290-294.
- Fernandez-Capetillo O, et al. 2002.** DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat Cell Biol* 4: 993-997.
- Flemming W. 1879.** Beiträge zur Kenntniss der Zelle und ihrer Lebenserscheinungen. *Arch Mikro Anat* 16: 302-436.
- Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ. 1994.** Photooxidative stress in plants. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* 92: 696-717.
- Galanty Y, Belotserkovskaya R, Coates J, Polo S, Miller KM, Jackson SP. 2009.** Mammalian SUMO E3-ligases PIAS1 and PIAS4 promote responses to DNA double-strand breaks. *Nature* 462: 935-939.
- Gellert M. 2002.** V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem* 71: 101-132.
- Giacinti C, Giordano A. 2006.** RB and cell cycle progression. *Oncogene* 25: 5220-5227.
- Gisselsson D, Pettersson L, Hoglund M, Heidenblad M, Gorunova L, Wiegant J, Mertens F, Dal Cin P, Mitelman F, Mandahl N. 2000.** Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5357-5362.
- Gisselsson D, Jonson T, Petersen A, Strombeck B, Dal Cin P, Hoglund M, Mitelman F, Mertens F, Mandahl N. 2001.** Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12683-12688.
- Giunta S, Belotserkovskaya R, Jackson SP. 2010.** DNA damage signaling in response to double-strand breaks during mitosis. *J Cell Biol* 190: 197-207.
- Goldberg M, Stucki M, Falck J, D'Amours D, Rahman D, Pappin D, Bartek J, Jackson SP. 2003.** MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint. *Nature* 421: 952-956.

- Goldman, Spector. 2005.** Live Cell Imaging a laboratory manual: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Goodarzi AA, Noon AT, Deckbar D, Ziv Y, Shiloh Y, Lobrich M, Jeggo PA. 2008.** ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol Cell* 31: 167-177.
- Haber JE. 2000.** Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet* 16: 259-264.
- Hall AG, Tilby MJ. 1992.** Mechanisms of action of, and modes of resistance to, alkylating agents used in the treatment of haematological malignancies. *Blood Rev* 6: 163-173.
- Hall EJ, Giaccia AJ. 2006.** Radiobiology for the radiologist: Lippincott Williams & Wilkins.
- Havens CG, Ho A, Yoshioka N, Dowdy SF. 2006.** Regulation of late G1/S phase transition and APC Cdh1 by reactive oxygen species. *Mol Cell Biol* 26: 4701-4711.
- Heald R, McKeon F. 1990.** Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* 61: 579-589.
- Heldin CH, Johnsson A, Wennergren S, Wernstedt C, Betsholtz C, Westermark B. 1986.** A human osteosarcoma cell line secretes a growth factor structurally related to a homodimer of PDGF A-chains. *Nature* 319: 511-514.
- Hell SS, Ernst H. K. 1992.** Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation. *Optics Communications* 93: 277-282.
- Helleday T, Lo J, van Gent DC, Engelward BP. 2007.** DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)* 6: 923-935.
- Henner WD, Grunberg SM, Haseltine WA. 1983.** Enzyme action at 3' termini of ionizing radiation-induced DNA strand breaks. *J Biol Chem* 258: 15198-15205.
- Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B. 1997.** 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1: 3-11.
- Hickson ID. 2003.** RecQ helicases: caretakers of the genome. *Nat Rev Cancer* 3: 169-178.
- Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, Liu D, Elledge SJ, Mak TW. 2000.** DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 287: 1824-1827.
- Hoffelder DR, Luo L, Burke NA, Watkins SC, Gollin SM, Saunders WS. 2004.** Resolution of anaphase bridges in cancer cells. *Chromosoma* 112: 389-397.
- Hoffman RM. 2005.** The multiple uses of fluorescent proteins to visualize cancer in vivo. *Nat Rev Cancer* 5: 796-806.
- Holliday R. 1964.** Mechanism for Gene Conversion in Fungi. *Genetical Research* 5: 282-&.
- Hsi RA, Rosenthal DI, Glatstein E. 1999.** Photodynamic therapy in the treatment of cancer: current state of the art. *Drugs* 57: 725-734.
- Huen MS, Sy SM, Chen J. 2010.** BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 138-148.
- Huisken J, Swoger J, Del Bene F, Wittbrodt J, Stelzer EH. 2004.** Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science* 305: 1007-1009.
- Jackman M, Firth M, Pines J. 1995.** Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus. *EMBO J* 14: 1646-1654.
- Jackman M, Kubota Y, den Elzen N, Hagting A, Pines J. 2002.** Cyclin A- and cyclin E-Cdk complexes shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *Mol Biol Cell* 13: 1030-1045.
- Joo HY, Zhai L, Yang C, Nie S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Chang C, Wang H. 2007.** Regulation of cell cycle progression and gene expression by H2A deubiquitination. *Nature* 449: 1068-1072.
- Kegel P, Riballo E, Kuhne M, Jeggo PA, Lobrich M. 2007.** X-irradiation of cells on glass slides has a dose doubling impact. *DNA Repair (Amst)* 6: 1692-1697.
- Kiefer J, Kiefer I. 2003.** Allgemeine Radiologie: Parey Buchverlag.
- Klar TA, Jakobs S, Dyba M, Egner A, Hell SW. 2000.** Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8206-8210.
- Koff A, Giordano A, Desai D, Yamashita K, Harper JW, Elledge S, Nishimoto T, Morgan DO, Franza BR, Roberts JM. 1992.** Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 257: 1689-1694.
- Kouzarides T. 2007.** Chromatin modifications and their function. *Cell* 128: 693-705.

- Krempler A, Deckbar D, Jeggo PA, Lobrich M. 2007.** An imperfect G2M checkpoint contributes to chromosome instability following irradiation of S and G2 phase cells. *Cell Cycle* 6: 1682-1686.
- Le Breton C, Dupaigne P, Robert T, Le Cam E, Gangloff S, Fabre F, Veaute X. 2008.** Srs2 removes deadly recombination intermediates independently of its interaction with SUMO-modified PCNA. *Nucleic Acids Res* 36: 4964-4974.
- Lees-Miller SP, Meek K. 2003.** Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie* 85: 1161-1173.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 1998.** Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396: 643-649.
- Leonhardt H, Rahn HP, Weinzierl P, Sporbert A, Cremer T, Zink D, Cardoso MC. 2000.** Dynamics of DNA replication factories in living cells. *J Cell Biol* 149: 271-280.
- Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. 2003.** Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 712-720.
- Lieber MR. 2010.** NHEJ and its backup pathways in chromosomal translocations. *Nat Struct Mol Biol* 17: 393-395.
- Lindahl T. 1993.** Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709-715.
- Lloyd J, Chapman JR, Clapperton JA, Haire LF, Hartsuiker E, Li J, Carr AM, Jackson SP, Smerdon SJ. 2009.** A supramodular FHA/BRCT-repeat architecture mediates Nbs1 adaptor function in response to DNA damage. *Cell* 139: 100-111.
- Lobrich M, Rydberg B, Cooper PK. 1995.** Repair of x-ray-induced DNA double-strand breaks in specific Not I restriction fragments in human fibroblasts: joining of correct and incorrect ends. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 12050-12054.
- Lobrich M, Shibata A, Beucher A, Fisher A, Ensminger M, Goodarzi AA, Barton O, Jeggo PA. 2010.** gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* 9: 662-669.
- Loffler H, Bochtler T, Fritz B, Tews B, Ho AD, Lukas J, Bartek J, Kramer A. 2007.** DNA damage-induced accumulation of centrosomal Chk1 contributes to its checkpoint function. *Cell Cycle* 6: 2541-2548.
- Lou Z, et al. 2006.** MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell* 21: 187-200.
- Lukas C, Falck J, Bartkova J, Bartek J, Lukas J. 2003.** Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nat Cell Biol* 5: 255-260.
- Lukas C, Melander F, Stucki M, Falck J, Bekker-Jensen S, Goldberg M, Lerenthal Y, Jackson SP, Bartek J, Lukas J. 2004.** Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *EMBO J* 23: 2674-2683.
- Lundgren K, Walworth N, Booher R, Dembski M, Kirschner M, Beach D. 1991.** mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell* 64: 1111-1122.
- Ma Y, Pannicke U, Lu H, Niewolik D, Schwarz K, Lieber MR. 2005.** The DNA-dependent protein kinase catalytic subunit phosphorylation sites in human Artemis. *J Biol Chem* 280: 33839-33846.
- Mailand N, Falck J, Lukas C, Syljuasen RG, Welcker M, Bartek J, Lukas J. 2000.** Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* 288: 1425-1429.
- Mailand N, Bekker-Jensen S, Bartek J, Lukas J. 2006.** Destruction of Claspin by SCFbetaTrCP restrains Chk1 activation and facilitates recovery from genotoxic stress. *Mol Cell* 23: 307-318.
- Mailand N, Bekker-Jensen S, Faustrup H, Melander F, Bartek J, Lukas C, Lukas J. 2007.** RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell* 131: 887-900.
- Martin RM, Leonhardt H, Cardoso MC. 2005.** DNA labeling in living cells. *Cytometry A* 67: 45-52.
- Maser RS, Mirzoeva OK, Wells J, Olivares H, Williams BR, Zinkel RA, Farnham PJ, Petrini JH. 2001.** Mre11 complex and DNA replication: linkage to E2F and sites of DNA synthesis. *Mol Cell Biol* 21: 6006-6016.
- Matsui SI, Seon BK, Sandberg AA. 1979.** Disappearance of a structural chromatin protein A24 in mitosis: implications for molecular basis of chromatin condensation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 6386-6390.
- Mazin AV, Mazina OM, Bugreev DV, Rossi MJ. 2010.** Rad54, the motor of homologous recombination. *DNA Repair (Amst)* 9: 286-302.

- Mazon G, Mimitou EP, Symington LS. 2010.** SnapShot: Homologous recombination in DNA double-strand break repair. *Cell* 142: 646, 646 e641.
- Mimitou EP, Symington LS. 2009.** DNA end resection: many nucleases make light work. *DNA Repair (Amst)* 8: 983-995.
- Moldovan GL, Madhavan MV, Mirchandani KD, McCaffrey RM, Vinciguerra P, D'Andrea AD. 2010.** DNA polymerase POLN participates in cross-link repair and homologous recombination. *Mol Cell Biol* 30: 1088-1096.
- Morgan DO. 1995.** Principles of CDK regulation. *Nature* 374: 131-134.
- Morgan DO. 2007.** The Cell Cycle: Principles of Control, Primer in Biology: New Science Press Ltd.
- Morris JR, et al. 2009.** The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress. *Nature* 462: 886-890.
- Moynahan ME, Jasin M. 2010.** Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 196-207.
- Musacchio A, Salmon ED. 2007.** The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 379-393.
- Nakamura AJ, Rao VA, Pommier Y, Bonner WM. 2010.** The complexity of phosphorylated H2AX foci formation and DNA repair assembly at DNA double-strand breaks. *Cell Cycle* 9: 389-397.
- Nasmyth K. 1996.** Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science* 274: 1643-1645.
- Nelson G, Buhmann M, von Zglinicki T. 2009.** DNA damage foci in mitosis are devoid of 53BP1. *Cell Cycle* 8: 3379-3383.
- Nghiem P, Park PK, Kim Y, Vaziri C, Schreiber SL. 2001.** ATR inhibition selectively sensitizes G1 checkpoint-deficient cells to lethal premature chromatin condensation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9092-9097.
- Nikolova T, Ensminger M, Lobrich M, Kaina B. 2010.** Homologous recombination protects mammalian cells from replication-associated DNA double-strand breaks arising in response to methyl methanesulfonate. *DNA Repair (Amst)* 9: 1050-1063.
- Noon AT, Shibata A, Rief N, Lobrich M, Stewart GS, Jeggo PA, Goodarzi AA. 2010.** 53BP1-dependent robust localized KAP-1 phosphorylation is essential for heterochromatic DNA double-strand break repair. *Nat Cell Biol* 12: 177-184.
- Ookata K, Hisanaga S, Okumura E, Kishimoto T. 1993.** Association of p34cdc2/cyclin B complex with microtubules in starfish oocytes. *J Cell Sci* 105 (Pt 4): 873-881.
- Parker LL, Piwnica-Worms H. 1992.** Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science* 257: 1955-1957.
- Peng CY, Graves PR, Thoma RS, Wu Z, Shaw AS, Piwnica-Worms H. 1997.** Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* 277: 1501-1505.
- Pihan G, Doxsey SJ. 2003.** Mutations and aneuploidy: co-conspirators in cancer? *Cancer Cell* 4: 89-94.
- Pines J. 1995.** Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J* 308 (Pt 3): 697-711.
- Porter LA, Donoghue DJ. 2003.** Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators. *Prog Cell Cycle Res* 5: 335-347.
- Rasband W, <http://rsb.info.nih.gov/ij>.** ImageJ.
- Rodriguez M, Yu X, Chen J, Songyang Z. 2003.** Phosphopeptide binding specificities of BRCA1 COOH-terminal (BRCT) domains. *J Biol Chem* 278: 52914-52918.
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. 1999.** Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146: 905-916.
- Rogers D. 1955.** Crawling Neutrophil Chasing a Bacterium.
- Ronneberger O, Baddeley D, Scheipl F, Verveer PJ, Burkhardt H, Cremer C, Fahrmeir L, Cremer T, Joffe B. 2008.** Spatial quantitative analysis of fluorescently labeled nuclear structures: problems, methods, pitfalls. *Chromosome Res* 16: 523-562.
- Rothkamm K, Lobrich M. 2003.** Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5057-5062.
- Saleh-Gohari N, Bryant HE, Schultz N, Parker KM, Cassel TN, Helleday T. 2005.** Spontaneous homologous recombination is induced by collapsed replication forks that are caused by endogenous DNA single-strand breaks. *Mol Cell Biol* 25: 7158-7169.

- San Filippo J, Sung P, Klein H. 2008.** Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* 77: 229-257.
- Sartori AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, Baer R, Lukas J, Jackson SP. 2007.** Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* 450: 509-514.
- Sato Y, Yoshikawa A, Mimura H, Yamashita M, Yamagata A, Fukai S. 2009.** Structural basis for specific recognition of Lys 63-linked polyubiquitin chains by tandem UIMs of RAP80. *EMBO J* 28: 2461-2468.
- Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, Halazonetis TD. 2000.** p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 151: 1381-1390.
- Shao G, Lilli DR, Patterson-Fortin J, Coleman KA, Morrissey DE, Greenberg RA. 2009.** The Rap80-BRCC36 de-ubiquitinating enzyme complex antagonizes RNF8-Ubc13-dependent ubiquitination events at DNA double strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 3166-3171.
- Shechter D, Costanzo V, Gautier J. 2004.** ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing. *Nat Cell Biol* 6: 648-655.
- Shimomura O. 2009.** Discovery of green fluorescent protein (GFP) (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 48: 5590-5602.
- Sims JJ, Cohen RE. 2009.** Linkage-specific avidity defines the lysine 63-linked polyubiquitin-binding preference of rap80. *Mol Cell* 33: 775-783.
- Simsek D, Jasin M. 2010.** Alternative end-joining is suppressed by the canonical NHEJ component Xrcc4-ligase IV during chromosomal translocation formation. *Nat Struct Mol Biol* 17: 410-416.
- Sisken JE, Morasca L. 1965.** Intrapopulation Kinetics of the Mitotic Cycle. *J Cell Biol* 25: 179-189.
- So S, Davis AJ, Chen DJ. 2009.** Autophosphorylation at serine 1981 stabilizes ATM at DNA damage sites. *J Cell Biol* 187: 977-990.
- Soutoglou E, Misteli T. 2008.** Activation of the cellular DNA damage response in the absence of DNA lesions. *Science* 320: 1507-1510.
- Stewart GS, Wang B, Bignell CR, Taylor AM, Elledge SJ. 2003.** MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* 421: 961-966.
- Stewart GS, et al. 2009.** The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell* 136: 420-434.
- Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP. 2005.** MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123: 1213-1226.
- Stucki M, Jackson SP. 2006.** gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair (Amst)* 5: 534-543.
- Sugden JK. 2004.** Photochemistry of dyes and fluorochromes used in biology and medicine: some physicochemical background and current applications. *Biotech Histochem* 79: 71-90.
- Svendsen JM, Harper JW. 2010.** GEN1/Yen1 and the SLX4 complex: Solutions to the problem of Holliday junction resolution. *Genes Dev* 24: 521-536.
- Syljuasen RG, Jensen S, Bartek J, Lukas J. 2006.** Adaptation to the ionizing radiation-induced G2 checkpoint occurs in human cells and depends on checkpoint kinase 1 and Polo-like kinase 1 kinases. *Cancer Res* 66: 10253-10257.
- Syljuasen RG. 2007.** Checkpoint adaptation in human cells. *Oncogene* 26: 5833-5839.
- Takata K, Shimizu T, Iwai S, Wood RD. 2006.** Human DNA polymerase N (POLN) is a low fidelity enzyme capable of error-free bypass of 5S-thymine glycol. *J Biol Chem* 281: 23445-23455.
- Takisawa H, Mimura S, Kubota Y. 2000.** Eukaryotic DNA replication: from pre-replication complex to initiation complex. *Curr Opin Cell Biol* 12: 690-696.
- Thyberg J, Moskalewski S. 1999.** Role of microtubules in the organization of the Golgi complex. *Exp Cell Res* 246: 263-279.
- van Attikum H, Gasser SM. 2009.** Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol* 19: 207-217.
- van Vugt MA, Bras A, Medema RH. 2004.** Polo-like kinase-1 controls recovery from a G2 DNA damage-induced arrest in mammalian cells. *Mol Cell* 15: 799-811.

- Vrouenraets MB, Visser GW, Snow GB, van Dongen GA. 2003.** Basic principles, applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy. *Anticancer Res* 23: 505-522.
- Wallace W. SLH, Swedlow J. R. 1998.** Introduction to Optical Microscopy, Digital Imaging, and Photomicrography. Pages <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/digitalimaging/deconvolution/deconintro.html>. <http://micro.magnet.fsu.edu>.
- Wang B, Matsuoka S, Carpenter PB, Elledge SJ. 2002.** 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science* 298: 1435-1438.
- Wang LH, Schwarzbraun T, Speicher MR, Nigg EA. 2008.** Persistence of DNA threads in human anaphase cells suggests late completion of sister chromatid decatenation. *Chromosoma* 117: 123-135.
- Ward JF. 1985.** Biochemistry of DNA lesions. *Radiat Res Suppl* 8: S103-111.
- Ward JF. 1988.** DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 35: 95-125.
- Ward JF. 1995.** Radiation mutagenesis: the initial DNA lesions responsible. *Radiat Res* 142: 362-368.
- Warmerdam DO, Kanaar R. 2010.** Dealing with DNA damage: relationships between checkpoint and repair pathways. *Mutat Res* 704: 2-11.
- Weinberg RA. 1995.** The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81: 323-330.
- Weinert TA, Hartwell LH. 1988.** The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 241: 317-322.
- Wessels JT, Yamauchi K, Hoffman RM, Wouters FS. 2010.** Advances in cellular, subcellular, and nanoscale imaging in vitro and in vivo. *Cytometry A* 77: 667-676.
- West SC. 2003.** Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 435-445.
- Wilson TE, Grawunder U, Lieber MR. 1997.** Yeast DNA ligase IV mediates non-homologous DNA end joining. *Nature* 388: 495-498.
- Wright GE, Hubscher U, Khan NN, Focher F, Verri A. 1994.** Inhibitor analysis of calf thymus DNA polymerases alpha, delta and epsilon. *FEBS Lett* 341: 128-130.
- Xu B, Kim S, Kastan MB. 2001.** Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol Cell Biol* 21: 3445-3450.
- Yamashiro S, Matsumura F. 1991.** Mitosis-specific phosphorylation of caldesmon: possible molecular mechanism of cell rounding during mitosis. *Bioessays* 13: 563-568.
- Yang H, Mizzen CA. 2009.** The multiple facets of histone H4-lysine 20 methylation. *Biochem Cell Biol* 87: 151-161.
- Yazdi PT, Wang Y, Zhao S, Patel N, Lee EY, Qin J. 2002.** SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes Dev* 16: 571-582.
- Zhang Y, Hefferin ML, Chen L, Shim EY, Tseng HM, Kwon Y, Sung P, Lee SE, Tomkinson AE. 2007.** Role of Dnl4-Lif1 in nonhomologous end-joining repair complex assembly and suppression of homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol* 14: 639-646.
- Zhao H, Watkins JL, Piwnica-Worms H. 2002.** Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14795-14800.

7 Anhang

7.1 Makro zur Messung der Signalqualität in Zeitserien aus der Lebenzellmikroskopie

Ein Handbuch zur ImageJ-Macro-Language ist auf der ImageJ-Website zu finden (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

```
// Initialisierung der Measure-Funktion, Abfrage des Speicherortes der Bilder, Abfrage
// der Dimensionen des Stapels
run("Set Measurements...", "area mean modal min integrated slice display redirect=None
decimal=3");
dir1 = getDirectory("Choose directory of pictures to be analysed");
z=getNumber("how many z planes?", 6);
t=getNumber("how many frames?",27);
metalist=getFileList(dir1);

// Öffnen der Bilder, Konvertierung zu einem Stack und Erstellung einer Maximum-
// Intensitäts-Projektion (MIP)
arg0= "open="+dir1+" number="+metalist.length+" starting=1 increment=1 scale=100 file=[]
or=[] convert sort";
run("Image Sequence...", arg0);
arg1="order=xyzct(default) channels=1 slices="+z+" frames="+t+" display=Grayscale"
run("Stack to Hyperstack...",arg1 );
arg1="start=1 stop="+z+" projection=[Max Intensity] all"
run("Z Project...",arg1 );
Res = dir1+"Frames"+File.separator;
File.makeDirectory(Res);
arg1="format=TIFF      name=frames      start=0      digits=3      save="+Res+"frames00.tif
save="+Res+"frames00.tif"
run("Image Sequence... ", arg1);
run("Close All Without Saving");

// Vorbereitung der Messung und der Abfrage der Cursor-Position sowie der Maus-Klicks
list = getFileList(Res);
run("Clear Results");
leftButton=16;
rightButton=4;

// Öffnen der Zeitserie von MIPs und Konvertierung zu einem Stack
for(n=0;n<list.length;n++){
    open(Res+list[n]);
    run("8-bit"); }
run("Images to Stack");

// Initialisierung der Variablen für die Messung
if (getVersion>="1.37r") setOption("DisablePopupMenu", true);
print ("Frame:Histomax:MeanSignalMax:intDensity:#Foci");
for(n=0;n<nSlices;n++){
    index=0;
    maxsum=0;
    meanIntDen=0;
    ex=0;
    s=n+1;
```

```
setSlice(s);
while (ex==0){
    getCursorLoc(lx, ly, lz, flags);

    // Messung innerhalb der manuell markierten Foci
    if (flags&leftButton!=0) {
        arg1="width=10          height=10          x="+lx+"          y="+ly+"
        slice="+getSliceNumber()+" oval centered";
        run("Specify...", arg1);
        run("Measure");
        meanIntDen+=getResult("IntDen", nResults-1);
        maxsum+=getResult("Max", nResults-1);
        index++;
    }

    // Messung des Hintergrundes (Histomax im Nukleus) und Ausgabe der
    Intensitäts-Mittelwerte für diese Zelle in eine Log-Datei
    if (flags&rightButton!=0) {
        ex=1;
        arg1="width=40          height=40          x="+lx+"          y="+ly+"
        slice="+getSliceNumber()+" oval centered";
        run("Specify...", arg1);
        run("Measure");
        print(s+": "+(getResult("Mode",
        1))+": "+(maxsum/index)+": "+(meanIntDen/index)+": "+index);
    }
    wait(200);
}

// Schließen aller Fenster und Speicherung der Log-Datei
close();
selectWindow("Log");
saveAs("txt",Res+"Results.txt");
if (getVersion>="1.37r") setOption("DisablePopupMenu", false);
```

7.2 Vollständige Abbildungen zu den Foci-Zählungen in der Lebendzellmikroskopie nach 1 Gy

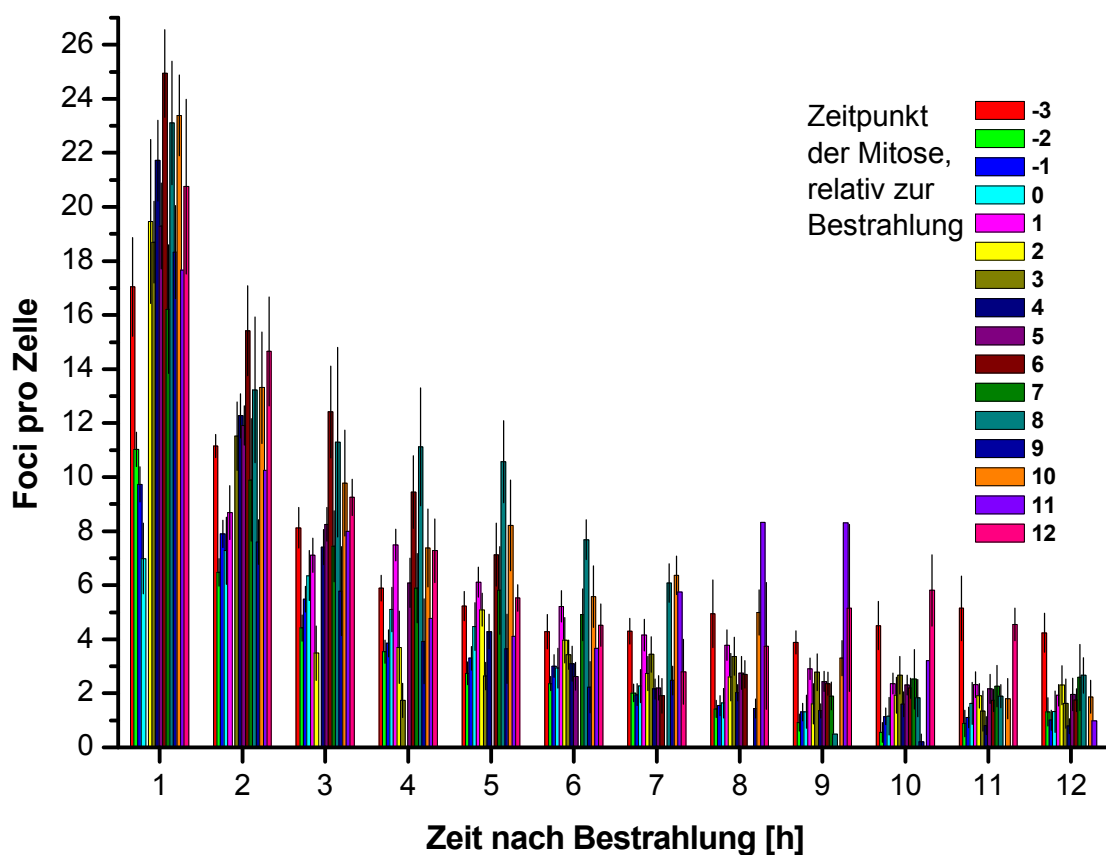


Abb. 45: Foci aus der Lebendzellmikroskopie in U-2 OS GFP-53BP1 Zellen nach 1 Gy. Die Daten sind untergliedert nach dem Zeitpunkt der Mitose relativ zur Bestrahlung. Der Datensatz „6“ enthält die Zellen, die sich sechs Stunden nach Bestrahlung geteilt haben. Negative Zahlen bedeuten dass die Zellteilung vor der Bestrahlung lag. Der in Abb. 18 beschriebene Hintergrund wurde abgezogen. Die Fehlerbalken sind die Standardfehler über die ausgewerteten Zellen.

7.3 Vollständige Abbildungen zu den Foci-Zählungen in der Lebendzellmikroskopie nach 2 Gy

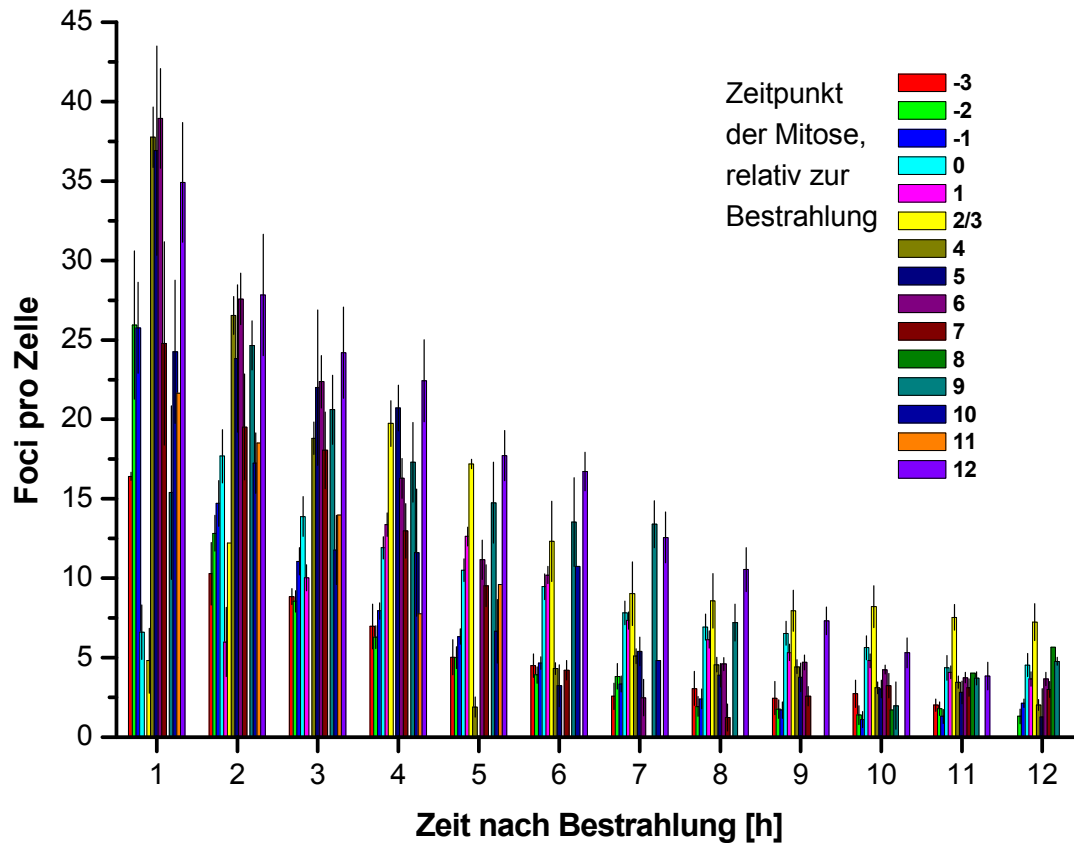


Abb. 46: Foci aus der Lebendzellmikroskopie in U-2 OS GFP-53BP1 Zellen nach 2 Gy. Die Daten sind untergliedert nach dem Zeitpunkt der Mitose relativ zur Bestrahlung. Der Datensatz „6“ enthält die Zellen, die sich sechs Stunden nach Bestrahlung geteilt haben. Negative Zahlen bedeuten dass die Zellteilung vor der Bestrahlung lag. Der in Abb. 18 beschriebene Hintergrund wurde abgezogen. Die Fehlerbalken sind die Standardfehler über die ausgewerteten Zellen.

7.4 Beschreibungen zu den beigelegten Filmen

Zur Erklärung morphologischer Kriterien oder Auswerteverfahren zum MI bzw. zum Schadenslevel, wurden repräsentative Filme als CD in den Anhang gegeben. Die Filme sind im *.avi- und im *.mov-Format abgespeichert.

7.4.1 Film-Anhang 1

Aufnahme der Mitose in der Lebendzellmikroskopie. Zwei wt U-2 OS-Zellen wurden im Durchlicht mit einem 63x Objektiv im Abstand von 3 min aufgenommen. Die Phasenkontrast-Bilder in einer Ebene zeigen zahlreiche Strukturen innerhalb der Zellen. Das Zytoplasma hebt sich klar gegen den Hintergrund ab. Innerhalb der beiden Zytoplasma-Massen befinden sich rund die Zellkerne. Innerhalb der Zellkerne sieht man kontrastreich die Nukleoli, Orte der Synthese ribosomaler RNAs. An der rechten Zelle seien die wichtigsten morphologischen Veränderungen während der Mitose genannt. Zu Beginn befindet sich die Zelle in G₂, nach 72 min ist die Auflösung der Nukleoli zu beobachten, und die beginnende Kondensierung der DNA zeigt sich in kleinen, länglichen Strukturen innerhalb des Zellkerns. Bis zur ca. 87 min befindet sich die Zelle in der Prophase, in der die Chromosomen weiter kondensieren. Die Trennung zwischen Kern und Zytoplasma verschwindet mit der Auflösung der Kernmembran. Innerhalb der Metaphase, bis zu 102ten Minute, ordnen sich die als Würmchen erkennbaren Chromosomen in einer Ebene zwischen den Zellpolen an. Nur zwei Frames liegen innerhalb der nun folgenden Anaphase, in der die Schwesterchromatiden vom Spindelfaserapparat getrennt und in Richtung der Zellpole gezogen werden. Während der Telophase bildet sich die Kernhülle beider Tochterzellen wieder aus, was nach 129 min zum ersten Mal sichtbar ist, und die DNA dekondensiert. Parallel hat die Zytokinese, die Trennung der Zytoplasma-Massen, durch Einschnürung stattgefunden.

7.4.2 Film-Anhang 2

Aufnahme zweier 82-6 hTert Zellkulturen in der Lebendzellmikroskopie. Alle 15 min wurde ein Bild mit einem 10x Objektiv erstellt. Oben rechts ist die Zeit relativ zur Bestrahlung eingeblendet. Zum Zeitpunkt 0 wurde die rechte Kultur mit 2 Gy bestrahlt, bei der linken Kultur wurde eine Bestrahlung simuliert. In den Bildern sind sowohl die Zellkerne als auch die abgekugelten mitotischen Zellen erkennbar. Als Zeitpunkt der Mitose wurde die Zytokinese jeder Mitose gewertet. Im rechten Bild ist nach der Bestrahlung ein deutlicher Rückgang in der Zahl der Mitosen zu beobachten, da der G₂/M-Checkpoint einsetzt. Eine Zelle befindet sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der Mitose und schließt diese innerhalb der ersten Stunde ab. Eine weitere Zelle tritt innerhalb der ersten Stunde noch in die Mitose ein und schließt diese in der zweiten Stunde nach Bestrahlung ab. Andere Mitosen beginnen erst ca. 6 h nach Bestrahlung.

7.4.3 Film-Anhang 3

Aufnahme dreier GFP-53BP1 U-2 OS-Zellen mit einem 40x Objektiv in der Lebendzellmikroskopie. Oben ist das im Nukleus vorliegende, dekonvolvierte GFP-53BP1-Signal zu sehen, unten ist die gesamte Zelle im Phasenkontrast-Bild erkennbar. Neben dem Maßstabsbalken ist oben rechts die Zeit relativ zur Bestrahlung eingeblendet. Zwischen Frame 6 und 7 erfolgte die Bestrahlung mit 1 Gy. Die Zelle links unten entwickelt nach Bestrahlung Foci, die im Laufe der Reparaturzeit weniger werden. Die Zelle rechts unten teilt sich am Anfang des Films, die Zytokinese ist in Frame 3 sichtbar. Zum Zeitpunkt der Bestrahlung befindet sie sich 2 h in G₁ und entwickelt Foci. Auch nach Dekonvolution ist das deutlichere Foci-Signal im Vergleich zu G₂-Zelle erkennbar. Die Zelle oben links wird in G₂ bestrahlt und entwickelt Foci. Im Anschluss erfolgt die Zellteilung (Prophase in Frame 10, Zytokinese in Frame 12), während der keine Foci in der Zelle erkennbar sind. Während der Frames 13-16 nimmt die Zahl der Foci in G₁ wieder zu, bevor die Zahl der Foci im Zuge der Reparatur in G₁ kleiner wird. Im Abstand von 30 min wurden im Durchlicht und im GFP-Kanal Bilderstapel mit einem 40x Objektiv aufgenommen. Der Bilderstapel bestand aus 6 Ebenen in einem Abstand von 800 nm. Der Film wurde im Anschluss dekonvolviert und über eine summierende Projektion auf eine Ebene reduziert.

7.4.4 Film-Anhang 4

Aufnahme einer GFP-MDC1 U-2 OS-Zelle mit einem 63x Objektiv während der Mitose. Oben ist das Phasenkontrast-Bild zu sehen, unten sind GFP-MDC1-Foci aus einem Bilderstapel mit 24 Ebenen im Abstand von 250 nm zu sehen. Unten links ist die Zeit nach Bestrahlung mit 1 Gy eingeblendet. Der Film startet während der Prophase, wie im Phasenkontrast-Bild erkennbar ist. Mit der Auflösung der Kernmembran (min 260/261) steigt der Hintergrund in der Zelle an. Die unten sichtbaren Foci kolokalisieren mit dem im Phasenkontrast sich dunkel abzeichnenden Chromatin (min 265-286). Die auch schon vor der Anaphase (min 283-290) schnelle Bewegung der individuellen Foci macht eine Verfolgung eines Fokus durch die Zellteilung schwierig. Ab der Ausbildung der Tochter-Zellkerne (min 291-295) ist die Zunahme der Foci deutlich. Die Fluoreszenz-Bilder wurden im Anschluss dekonvolviert und in eine Ebene projiziert. Der Maßstabsbalken beträgt 10 μm .

7.5 Lebenslauf

Name:	Eik Schumann
Geburtsdatum:	28.03.1980
Geburtsort:	Hamburg-Harburg
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Ausbildung

August 1986:	Einschulung an der Rudolf Steiner Schule Hamburg-Harburg
Juni 1999:	Allgemeine Hochschulreife an der Rudolf Steiner Schule Hamburg-Harburg
WS 1999:	Beginn des Grundstudiums Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.
Juli 2004 - Juli 2005:	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Prof. Reski, Universität Freiburg mit dem Thema "Alternatives Spleißen in <i>Physcomitrella patens</i> "
SS 2005:	Abschluss des Biologiestudiums mit Diplom, mit dem Hauptfach Pflanzenzenbiotechnologie

Beruflicher Werdegang

November 2005 - Februar 2006:	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Universitätsklinikum Freiburg i. Br. Arbeitsgruppe Prof. Schüle
seit Mai 2006:	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe Prof. Löbrich, Biophysik, im Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg Saar
Oktober 2007:	Umzug an die Technische Universität Darmstadt, Arbeitsgruppe Prof. Löbrich, <i>Radiation Biology and DNA Repair</i>

7.6 Danksagung

Mein erster Dank gilt meiner Frau Tatjana, die einen Großteil der Lasten meiner Promotion hat tragen müssen. Ihre Energie und Tatkraft ermöglichte oft meine Konzentration auf die Arbeit.

Ich bedanke mich bei Prof. Markus Löbrich für die Gelegenheit zur Promotion. Von Ihm stammen Projekt-Idee und die Mittel zur Durchführung. Die kritische Diskussion der Ergebnisse war für mich immer motivierend.

Bei Prof. Adam Bertl bedanke ich mich für die Bereitschaft ein Gutachten meiner Dissertation anzufertigen.

Prof. Kay Hamacher und Prof. Christoph Schüth sei für ihren Aufwand gedankt, meiner Disputation als Prüfer beizuwohnen.

Dr. Rudi Drescher war mir im Abschnitt der Etablierung der Technik und der Kontrollversuche eine große Hilfe und wichtiger Diskussionspartner.

Dr. Dorothee Deckbar hat mir in der zweiten Hälfte meiner Arbeit oft beratend oder erklärend zur Seite gestanden. Besonders ihr riesiges Engagement beim Korrekturlesen meiner Dissertation ist kaum wieder gut zu machen.

Der gesamten Arbeitsgruppe Löbrich danke ich für ein Miteinander, welches immer durch Kollegialität, meistens durch Freundlichkeit und manchmal durch Albernheit gekennzeichnet war. Danke, dass ihr meinen Eigenarten immer mit Höflichkeit begegnet seid.

7.7 Tagungsbeiträge:

Teile dieser Arbeit wurden in Vorträgen oder Postern präsentiert.

7.7.1 Vorträge

Barbara Koch, Eik Schumann, Rudolf Drescher und Markus Löbrich (2007)
„Checkpoint-Messung in lebenden Zellen“
10. Jahrestagung 2007 der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V. (GBS), Mainz.

Barbara Koch, Eik Schumann, Dorothee Deckbar, Tom Stiff, Penny Jeggo and Markus Löbrich (2009)
„The Interplay of DSB repair and Checkpoint control in living cells“
2nd German-French DNA Repair Meeting 2009, Deutsche Gesellschaft für DNA-Reparaturforschung (DGDR), Konstanz.

7.7.2 Poster

Eik Schumann, Rudolf Drescher, Dorothee Deckbar, Andrea Krempler und Markus Löbrich (2008)
„Charakterisierung des G2/M-Checkpoints nach ionisierender Bestrahlung mittels Lebendzellmikroskopie“
11. Jahrestagung 2008 der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V. (GBS), Tübingen.

Eik Schumann, Dorothee Deckbar and Markus Löbrich (2009)
„Characterization of Cell Cycle Control and Damage Level at the G2/M Border using Live Cell Imaging“
12. Jahrestagung 2009 der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V. (GBS), Essen.

Eik Schumann, Barbara Koch, Dorothee Deckbar und Markus Löbrich (2010)
„The Limitations of Cell Cycle Checkpoints“
13. Jahrestagung 2010 der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V. (GBS), Hamburg.

7.8 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Darmstadt, den 27.01.2011

(Eik Schumann)